



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

Anelise Pereira Alves

**Efeitos da vitamina D no comportamento motivacional e na neuroplasticidade
hipocampal em ratos adolescentes expostos ao álcool e estresse no início da
vida**

Florianópolis

2022

Anelise Pereira Alves

**Efeitos da vitamina D no comportamento motivacional e na neuroplasticidade
hipocampal em ratos adolescentes expostos ao álcool e estresse no início da
vida**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Mestra em Neurociências.

Orientador(a): Prof.(a) Dr(a) Patrícia de Souza Brocardo

Florianópolis

2022

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

Alves, Anelise

Efeitos da vitamina D no comportamento motivacional e na neuroplasticidade hipocampal em ratos adolescentes expostos ao álcool e estresse no início da vida / Anelise Alves ; orientador, Patricia de Souza Brocardo, 2022.
82 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós Graduação em Neurociências, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Neurociências. 2. TEAF. 3. neuroplasticidade hipocampal. 4. estresse precoce. 5. vitamina D. I. de Souza Brocardo, Patricia . II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Neurociências. III. Título.

Anelise Pereira Alves

**Efeitos da vitamina D no comportamento motivacional e na neuroplasticidade
hipocampal em ratos
adolescentes expostos ao álcool e estresse no início da vida.**

O presente trabalho em nível de Mestrado foi avaliado e aprovado, em 15/12/2022
pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof.(a) Heloisa Ghizoni Dr.(a)

Instituição Faculdade Anhanguera São José/SC

Prof.(a) Eloisa Pavesi Dr.(a)

Instituição Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.(a) Manuella Pinto Kaster Dr.(a)

Instituição 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 Mestra em Neurociências pelo
Programa de Pós-Graduação em Neurociências.

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof.(a) Patricia de Souza Brocardo Dr.(a)

Orientadora

Florianópolis, 2022.

AGRADECIMENTOS

A minha mãe Ana Maria, pela rede de apoio, por ser fonte de cuidado e amor.

Ao meu pai Vicente, que mesmo sem ter tido as mesmas oportunidades que eu, sempre acreditou na importância dos estudos e me incentivou e proporcionou realizar um mestrado em outro estado.

Minha irmã Ana Paula e meu cunhado Lucas, que sempre foram fonte de inspiração na pesquisa e na vida.

Meu companheiro Felipe, que está comigo desde o início do mestrado, agradeço por todo incentivo, paciência e pela rede de apoio.

Minha menina, minha companheira, Sofia, que ainda nem chegou e já me proporcionou tanta sabedoria, como diz seu nome.

Minha filhinha de quatro patas, Shiva, que segura minha saúde mental em vários momentos.

A toda equipe do LANEP, Thayza, Priscilla, Marina, Evelini, Aléxia, Patricia Marzola, Laura, foi muito bom dividir as experiências de laboratório com vocês. Um agradecimento especial a Bruna Pierone e Evelini que me ajudaram e ensinaram tanto, que ficaram até tarde comigo fazendo imunohistoquímica.

A Amanda Valeriano e Patricia Marzola que me ajudaram na contagem de células.

A Aletícia que me ajudou a tirando as fotos que eu precisava, quando eu estava longe.

Um agradecimento especial para minha amiga Aléxia, que é um grande presente desse mestrado e dividiu os momentos mais difíceis e fez esse momento ser muito mais leve.

A Claudia, que desde o início e até o final, sempre me ajudou e me ensinou tanto sobre esse trabalho, sobre Ciência e sobre a vida.

A minha orientadora, Patricia Brocardo, por me permitir ingressar no Laboratório de Neuroplasticidade e pelos ensinamentos e paciência nos momentos desafiadores.

A todos os professores (as) do Programa de pós-graduação em Neurociências, por compartilharem tanto conhecimento. Em especial as professoras Eloisa, Elisa, Kieiv e Viviane, pelos aprendizados nas discussões do nosso grupo.

A professora Manuella Kaster e Ana Lúcia por cederem seus laboratórios para realizarmos experimentos. Aos colegas do Laboratório de Neurociência Translacional e LANED, pela amizade e ensinamentos compartilhados.

Um agradecimento especial as técnicas Maísa e Elis do Laboratório Multiusuários Estudos em Biologia (LAMEB) por toda paciência e ensinamentos.

As amigas que Florianópolis me proporcionou, Gabi, Carol e Tai, que foram lar e rede de apoio fora de casa.

As amigas da vida, Bárbara Ramana, Letícia Picorone, Nanda, Aline Matilde, que independente da distância, estão sempre presentes.

As profissionais de saúde Viviane Valemis e Isabelle Moraes por cuidarem da minha saúde nos momentos mais desafiadores.

Aos animais que participaram desse estudo.

A CAPES pelo suporte financeiro durante todo esse tempo, que permitiu a realização desse trabalho.

A UFSC, pela excelência no que se propõe e por toda estrutura física.

Muito obrigada!

**“Que nada nos defina, que nada nos sujeite. Que a liberdade seja a nossa
própria substância, já que viver é ser livre.”**

(Simone de Beauvoir)

RESUMO

O transtorno do espectro alcoólico fetal (TEAF) pode ocasionar alterações comportamentais e neuromorfológicas permanentes. Os indivíduos com TEAF geralmente estão expostos ao estresse precoce durante a infância e apresentam maior incidência de transtornos psicológicos e comportamentais no futuro. O objetivo desse trabalho foi avaliar os efeitos da vitamina D na neuroplasticidade hipocampal em animais adolescentes que foram expostos precocemente ao álcool e estresse por separação materna e o comportamento motivacional. Foram organizados 16 grupos experimentais e a exposição ao álcool (5g/kg/dia, i.p.) ocorreu 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 separação materna (SM) ocorreu entre os dias 02 e 14 por três horas diárias e 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 para avaliação da motivação e frustração foram realizados no dia pós-natal (DPN) 40 e os animais eutanasiados no DPN 46. Foram realizadas análises histológicas com imunomarcação de DCX para avaliar a diferenciação neuronal e análise de Sholl para avaliar a ramificação dendrítica. Os principais resultados mostraram que a vitamina D foi capaz de provocar uma reversão parcial do comportamento anedônico, aumentou comportamentos motivacionais e diminuiu aspectos de frustração nos animais submetidos ao álcool e estresse no início da vida. Além disso, a vitamina D aumentou a diferenciação neuronal ao mesmo tempo que diminuiu a maturação precoce dos neurônios no giro denteado, igualando com padrões controle para o neurodesenvolvimento. Dessa forma, pode-se concluir que a vitamina D modulou positivamente a neuroplasticidade hipocampal, no entanto, faz-se necessário mais estudos para entender os mecanismos que controlam essa modulação.

Palavras-chave: TEAF; neuroplasticidade hipocampal; vitamina D.

ABSTRACT

Fetal alcohol spectrum disorder (FASD) can cause permanent behavioral and neuromorphological changes. Individuals with FASD are generally exposed to early stress during childhood and have a higher incidence of psychological and behavioral disorders later in life. This work aimed to evaluate the effects of vitamin D on hippocampal neuroplasticity in adolescent animals exposed early to alcohol and maternal separation stress. Sixteen experimental groups were organized, and exposure to alcohol (5g/kg/day, i.p.) occurred on days 04, 06, 08, and 10 of the postnatal period; this time window corresponds to the period of development related to the third trimester of pregnancy in humans. The stress protocol due to maternal separation (SM) occurred between days 02 and 14 for three hours daily. Vitamin D was administered to the animals from day 22 and continued for 15 days, a period corresponding to late childhood in humans. Behavioral tests were performed to assess motivation and frustration at DPN 40, and the animals were euthanized at DPN 46. Histological analyzes were performed with DCX immunostaining to assess neuronal differentiation and Sholl analysis to assess the dendritic branching. The main results showed that vitamin D was able to cause a partial reversal of anhedonic behavior, increased motivational behaviors, and decreased aspects of frustration in animals subjected to alcohol and stress in early life. Furthermore, vitamin D increased neuronal differentiation while decreasing the early maturation of neurons in the dentate gyrus, matching control patterns for neurodevelopment. Thus, it can be concluded that vitamin D positively modulated hippocampal neuroplasticity; however, further studies are needed to understand the mechanisms that control this modulation.

Keywords: FASD; hippocampal neuroplasticity; vitamin D.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 ÁLCOOL	13
1.1.1 Metabolismo do álcool	14
1.1.2 Álcool e o encéfalo: alvos moleculares	16
1.2 O CONSUMO DE ÁLCOOL NA GESTAÇÃO	17
1.2.1 Transtorno do Espectro Alcoólico Fetal	19
1.3 MODELOS EXPERIMENTAIS DE TEAF	22
1.4 NEUROPLASTICIDADE	25
1.4.1. Formação hipocampal	29
1.4.2. Alterações da neuroplasticidade hipocampal ocasionada pela exposição ao álcool durante o desenvolvimento	30
1.5 ESTRESSE PRECOCE	31
1.5.1 Estresse precoce como agravante da exposição ao álcool durante o desenvolvimento	32
1.5.2 Comportamento de frustração e EPA	32
1.6 TRATAMENTO PARA O TRANSTORNO DO ESPECTRO ALCOÓLICO FETAL	36
1.7 VITAMINA D	36
1.7.1 Atuação da Vitamina D no SNC	38
2 HIPÓTESE EXPERIMENTAL	41
3 JUSTIFICATIVA	42
4 OBJETIVOS	43
4.1 OBJETIVO GERAL	43

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	43
5 MATERIAIS E MÉTODOS	44
5.1 ANIMAIS	44
5.2 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS	44
5.2.1 Protocolo de exposição precoce ao álcool	46
5.2.2 Protocolo por separação materna.....	46
5.2.3 Tratamento com vitamina D.....	46
5.3 AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL.....	47
5.3.1 Análises motivacionais	47
5.4 AVALIAÇÃO POR IMUNOHISTOQUÍMICA	48
5.4.1 Processamento do tecido encefálico.....	48
5.4.2 Imunomarcção para diferenciação celular	49
5.5 AVALIAÇÃO DA ARBORIZAÇÃO DENDRÍTICA.....	50
5.5.1 Processamento do encéfalo para a impregnação com Golgi.....	50
5.5.2 Análise de Sholl.....	50
5.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	51
6 RESULTADOS.....	52
6.1 EFEITOS DA VITAMINA D SOBRE A INGESTÃO DE ALIMENTO PALATÁVEL EM ANIMAIS NÃO PRIVADOS DE ALIMENTO.....	54
6.2 EFEITOS DA VITAMINA D SOBRE A FRUSTRAÇÃO EM ANIMAIS NÃO PRIVADOS DE ALIMENTO	54
6.3 EFEITO DA VITAMINA D SOBRE A DIFERENCIAÇÃO NEURONAL HIPOCAMPAL	56

6.4 EFEITO DA VITAMINA D NA ARBORIZAÇÃO DENDRÍTICA DE CÉLULAS GRANULARES DO GIRO DENTEADO	58
7 DISCUSSÃO	60
8 CONCLUSÃO	66
REFERÊNCIAS.....	67

1 INTRODUÇÃO

1.1 ÁLCOOL

A utilização do álcool em bebidas deixou sua marca na história de diferentes civilizações e culturas, sumérios, egípcios, gregos, chineses. A primeira evidência de utilização do álcool em bebidas alcoólicas data 7000 a 6600 a.C. no norte da China. Essas evidências foram encontradas em vasos de barro que continham preparados fermentados de frutas, arroz, mel, entre outros. Os sumérios e egípcios faziam cerveja e consumiam devido aos seus benefícios nutricionais e até mesmo a cura de diversas doenças. Além disso, era utilizada em festivais, celebrações e rituais religiosos. Os gregos e romanos tiveram como produção inicial os vinhos (KELLER, 1979; STOLBERG, 2006).

As civilizações utilizavam as bebidas alcoólicas com diversos propósitos como cura para diferentes males, comemorações, rituais religiosos, sacrifício para os deuses. Teve papel importante no século 19 e 20 na guerra civil em que enfermeiras e médicos utilizavam como sedação e medicação (KHADERI, 2019). Como acreditava-se na época que o álcool possuía várias propriedades medicinais, isso valia também para as gestantes. Dessa forma, ele foi utilizado sem restrições pelas grávidas durante vários séculos. O conhecimento da teratogenicidade do álcool era pouco conhecido ou ignorado. O primeiro estudo publicado que mostrou que o álcool era o principal agente causador (250% a mais) da mortalidade de bebês em mães alcoolistas foi realizado por William Sullivan em 1899 (SULLIVAN, 2011).

1.1.1 Metabolismo do álcool

O álcool é uma classe de composto orgânico que possui hidroxilas (OH) ligadas a grupos de carbono. O etanol é o tipo de álcool mais conhecido, utilizado como combustível, solventes e sendo o principal composto de bebidas alcoólicas (WADE,2022).

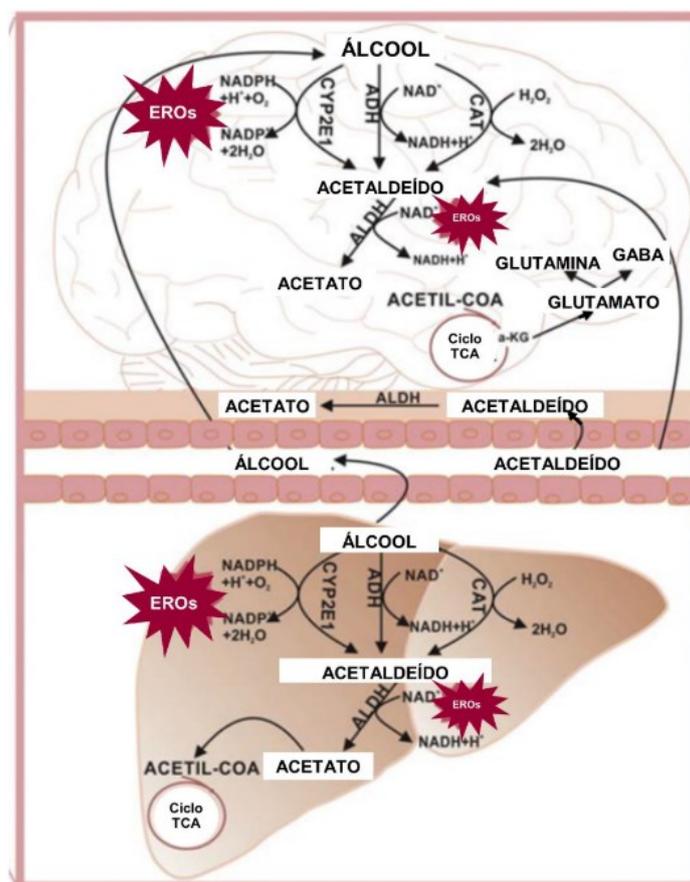
A metabolização do álcool ocorre no ser humano em diversas etapas e envolve alguns órgãos como fígado, estômago, jejuno. A maior parte desse processo ocorre no fígado e por essa razão é o órgão que mais sofre os danos (DOODY et al., 2017). O álcool atravessa as membranas através de difusão passiva, a favor do seu gradiente de concentração. É praticamente insolúvel em gorduras, sendo solúvel na água, dessa forma, se distribui por tecidos e fluidos proporcional ao seu conteúdo de água (CEDERBAUM, 2012).

Ao chegar no fígado o álcool sofrerá metabolização pela via oxidativa e não-oxidativa. Na via oxidativa, o primeiro passo é a oxidação pela enzima álcool desidrogenase (ADH) convertendo em acetaldeído. E em condições de excesso de álcool na circulação, parte será oxidada pela citocromo P450 2E1 (CYP2E1) produzindo acetaldeído através de espécies reativas de oxigênio. Em seguida, o acetaldeído é convertido para acetato através da enzima aldeído desidrogenase (ALDH). O acetato pode ser convertido em acetil coenzima A (acetil-CoA) que pode ser oxidado no ciclo tricarbóxico (TCA) (Figura 1) (DOODY et al., 2017; HYUN et al., 2021).

A maior parte do álcool é metabolizado no fígado, no entanto, quando em excesso, parte desse álcool atravessa livremente a barreira hematoencefálica (BHE) por difusão passiva. Sabe-se que a principal enzima envolvida Nesse

processo É a ADH que está presente no encéfalo em baixas quantidades. Nessas condições, a metabolização é realizada principalmente pela catalase (CAT) e pela CYP 2E1, gerando espécies reativas de oxigênio (EROs) como é demonstrado na (Figura 1). Além disso, uma pequena parcela de acetaldeído também entra no encéfalo através da periferia(ATKIN; ICH, 1997; GIL-MOHAPEL et al., 2019).

Figura 1: Metabolismo do álcool no encéfalo e no fígado



O etanol será metabolizado em duas etapas: na primeira etapa tem a formação de acetaldeído pela enzima ADH e em menor quantidade pelas enzimas CYP2E1 e CAT. Na segunda etapa tem a formação de acetato pela enzima ALDH, gerando também acetil-CoA que participará do ciclo TCA e EROs. O mesmo vai ocorrer no encéfalo, no entanto, a principal enzima

responsável pela formação de acetaldeído é a CAT seguida da CYP 2E1.

Fonte: Adaptado de Gil-Mohapel et al, 2019.

1.1.2 Álcool e o encéfalo: alvos moleculares

O uso de álcool produz efeitos amplos e diversos no sistema nervoso central (SNC). A exposição ao álcool altera os mecanismos de sinalização intracelular, levando a alterações na expressão gênica, remodelamento da cromatina e tradução (EGERVARI et al., 2021). O álcool se liga a vários receptores transmembrana, incluindo receptores de glutamato, GABA e dopamina, bem como a receptores para diferentes neuropeptídeos e fatores neurotróficos. Estes, por sua vez, afetam a atividade de várias cascatas de segundos mensageiros e vias de sinalização intracelular. Essas vias medeiam adaptações celulares duradouras que afetam, entre outros, a tradução e a plasticidade sináptica, e que contribuem para as adaptações neuronais subjacentes ao consumo de álcool.

Os efeitos do álcool se devem principalmente a sua interação com proteínas envolvidas na transmissão sináptica excitatória e inibitória, agindo como agonista de receptores ácido gama-aminobutírico (GABA), glicina (GlyRs) e antagonista de receptores ionotrópicos como o N-metil D-Aspartato (NMDA), alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico (AMPA) e cainato (ROBERTO; KIRSON; KHOM, 2021). Esse efeito causa um desbalanço na atividade excitatória/inibitória a curta e longo prazo. Esses receptores também são afetados por neurotrofinas que também sofrem os efeitos do álcool (ABRAHAO; SALINAS; LOVINGER, 2017; EGERVARI et al., 2021).

As neurotrofinas são fatores neurotróficos, muito importantes na plasticidade sináptica e formação da memória na fase adulta. Durante o neurodesenvolvimento diversas neurotrofinas são cruciais para a vasculogênese embrionária, proliferação e migração celular. Na neurogênese embrionária, neurotrofinas como NT-3, NGF, BDNF e VEGF estão presentes e abundância e contribuem para o processo de proliferação e migração celular (ELLERO et al., 2022). A exposição ao álcool durante o neurodesenvolvimento afeta a sinalização dessas neurotrofinas e a expressão dos seus receptores (BOSCHEN; KLINTSOVA, 2017) o que pode afetar o processo de neurogênese (VILAR; MIRA, 2016).

1.2 O CONSUMO DE ÁLCOOL NA GESTAÇÃO

O álcool é considerado uma substância psicoativa, amplamente consumida no mundo e uma das mais antigas (KELLER, 1979). O consumo de forma nociva está associado a diversas doenças, problemas econômicos e sociais, sendo responsável por 5,3% de mortes no mundo. É um fator causal de mais de 200 doenças e lesões e está amplamente associado a distúrbios mentais e comportamentais (WHO Global, 2018).

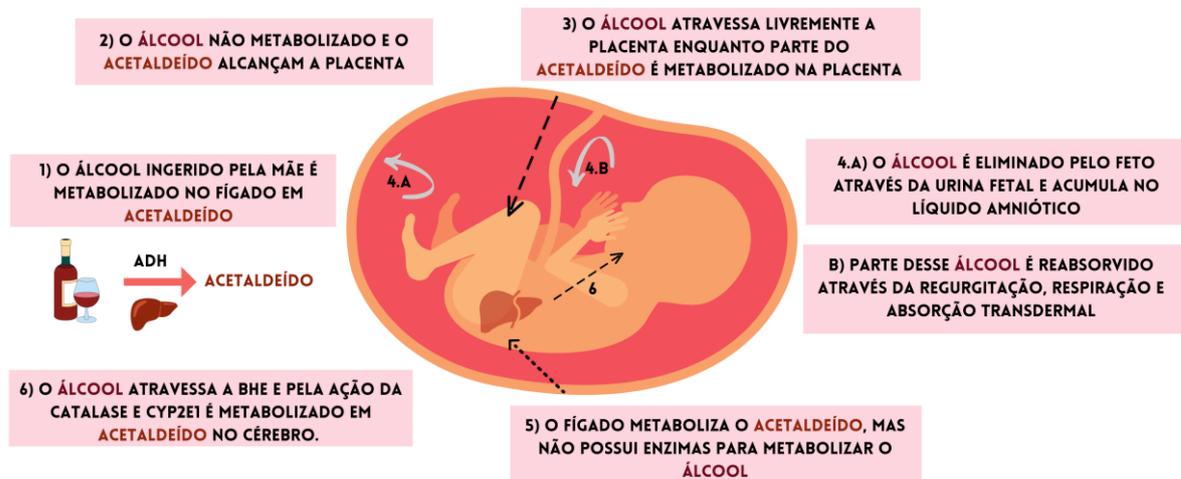
Nos últimos anos, houve um aumento no consumo do álcool pelas mulheres, tanto em quantidade quanto em frequência. E isso provavelmente se deve as mudanças nos estilos de vida das mulheres (MANTHEY et al., 2019). De acordo com dados do Ministério da Saúde, o consumo abusivo de álcool entre as mulheres apresentou um crescimento de 7,7% para 11%, no período de 2006 a 2018. E além disso, de acordo com a OMS, 1,6% das mulheres brasileiras

apresentam algum transtorno relacionado ao álcool, sendo que 0,5% apresentam diagnóstico de dependência (ANDRADE et al., 2020). E estes dados se tornam preocupantes pelo fato de que as mulheres são fisiologicamente mais afetadas pelo álcool, em comparação aos homens. Isso se deve as alterações farmacocinéticas do álcool atribuídas a fatores como uma maior proporção de gordura corporal/água, menor quantidade de enzimas responsáveis pela metabolização do álcool (WARD; COUTELLE, 2003).

O consumo de álcool durante a gravidez é um problema grave, que tem efeitos negativos no crescimento e desenvolvimento fetal e que podem perdurar durante a vida (POPOVA et al., 2013). Estima-se que mundialmente cerca de 1 a cada 10 mulheres consomem álcool durante a gravidez (POPOVA et al., 2017).

O álcool consumido pela mãe atravessa livremente a placenta, isso então significa que a concentração de álcool no sangue fica comparável à da mãe ou até mesmo maior. O feto apresenta pequenas quantidades das enzimas CAT e CYP2E1, portanto uma pequena parte do álcool será metabolizado no encéfalo do feto. O álcool é eliminado pelo feto e acumulado no líquido amniótico e é reincorporado através da respiração e absorção transdermal (Figura 2). A exposição precoce ao álcool (EPA) pode gerar diversos prejuízos, como baixo peso ao nascer, malformações fetais, distúrbios do neurodesenvolvimento, incluindo Transtorno do Espectro Alcoólico Fetal (TEAF) (BURD; BLAIR; DROPPS, 2012; HELLER; BURD, 2014).

Figura 2: Álcool no metabolismo fetal



Fonte: Autoria própria

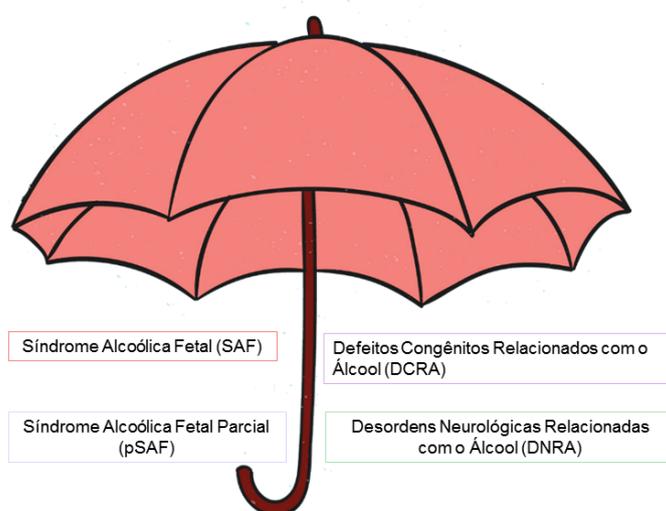
1.2.1 Transtorno do Espectro Alcoólico Fetal

Os efeitos da EPA podem afetar todos os estágios do neurodesenvolvimento, ocasionando malformações congênitas, comprometimento do crescimento e alterações neurológicas importantes, como distúrbios neurocomportamentais, déficits no aprendizado, problemas motores e cognitivos. Esses efeitos vão se distinguir de acordo com o período e a quantidade de álcool ingerida pela mãe (POPOVA et al., 2013; RILEY; INFANTE; WARREN, 2011). O exato mecanismo responsável por essas alterações ainda não é conhecido. No entanto, já foram relatados diversos mecanismos que podem estar relacionados com os efeitos decorrentes da EPA (SULIK, 2014). Dentre eles destaca-se a diminuição da neuroplasticidade hipocampal (FONTAINE et al., 2016; GIL-MOHAPEL et al., 2010), indução de estresse oxidativo (BROCARDI et al., 2011), bem como o aumento da apoptose (IKONOMIDOU et al., 2000).

O TEAF é um termo “guarda-chuva” (Figura 3) utilizado para descrever os diferentes fenótipos gerados pela EPA. A Síndrome Alcoólica Fetal (SAF) é a consequência mais grave da exposição ao álcool durante o desenvolvimento e foi descrita pela primeira vez em 1973 (JONES; SMITH, 1973) . Na SAF há um complexo comprometimento físico, comportamental e cognitivo dos indivíduos (GUPTA; GUPTA; SHIRASAKA, 2016). A Síndrome Alcoólica parcial (pSAF) é uma forma um pouco mais branda de SAF onde nem todos os critérios para diagnóstico de SAF estão presentes. Os Defeitos Congênitos Relacionados com o Álcool (DCRA) inclui indivíduos com desvios físicos menores ou maiores, mas sem comprometimentos comportamentais ou cognitivos, enquanto que nas Desordens Neurológicas Relacionadas com o Álcool (DNRA) descreve um desenvolvimento cognitivo atípico e desvios comportamentais entre indivíduos com desenvolvimento físico normal (EHRHART et al., 2019; LANGE et al., 2017).

Figura 3 - Transtornos do Espectro Alcoólico Fetal (TEAF).

TEAF é um termo guarda-chuva que contempla os déficits causados por consumo de álcool materno.

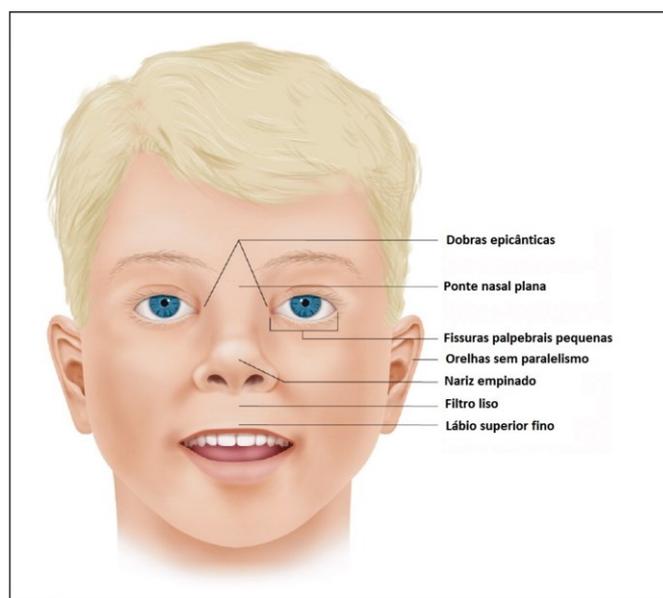


Fonte: Autoria própria

O diagnóstico de TEAF é difícil e requer experiência profissional. Nas formas mais graves SAF e pSAF requerem a presença de anomalias faciais características, inicialmente identificados por Jones e Smith (1973), incluindo fissuras palpebrais curtas, borda vermelha fina e filtro, liso representado na (Figura 4). Além disso, um diagnóstico de SAF requer evidência de deficiência de crescimento (altura e/ou peso ≤ 10 percentil para idade gestacional), crescimento cerebral anormal (circunferência cefálica 10º percentil (CROCKER; NGUYEN; MATTSON, 2011).

Figura 4: Representação das alterações morfológicas na

Síndrome Alcoólica Fetal



Fonte: Adaptado de Wattendorf, D.J., Muenke, M., 2005.

Os critérios fenotípicos faciais são mais fáceis de serem identificados, no entanto, aspectos cognitivos e comportamentais são compartilhados com outros distúrbios do neurodesenvolvimento e psiquiátricos, como Transtorno do Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH), Transtorno do Espectro Autista (TEA),

Esquizofrenia, Deficiência Intelectual, Transtornos do Humor, entre outros (MAYA-ENERO et al., 2021).

1.3 MODELOS EXPERIMENTAIS DE TEAF

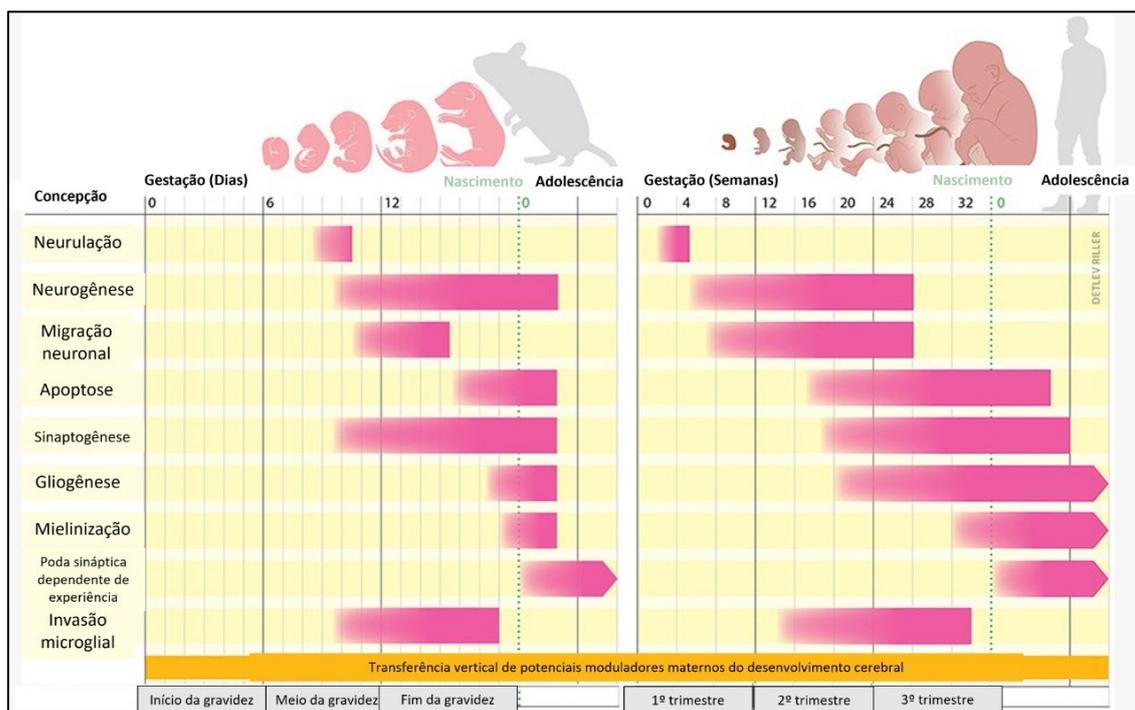
Os modelos animais mais utilizados para o estudo da exposição precoce ao álcool são ratos e camundongos. No entanto também existem estudos com macacos, porquinho da Índia, zebrafish (*Danio rerio*), e com o invertebrado *Caenorhabditis elegans*, (CHERNOFF, 2010; LOUCKS; AHLGREN, 2012).

Os estudos com roedores podem ser classificados em duas grandes áreas: exposição pré-natal e exposição pós-natal ao álcool. Os modelos com exposição pré-natal são utilizados para estudar os efeitos do álcool no período equivalente ao primeiro e segundo trimestre em humanos, já o modelo pós-natal é utilizado para estudar os efeitos no terceiro trimestre equivalente. A ontogenia é utilizada para fazer inferências sobre a maturação do cérebro em animais e humanos, e, dessa forma, pressupor as fases equivalentes do desenvolvimento na gestação (ALMEIDA et al., 2020; BOSCHEN; KLINTSOVA, 2017).

Diferentes processos ocorrem nessas fases e alguns períodos são mais críticos para o neurodesenvolvimento. No primeiro trimestre gestacional temos a neurulação, em que vai ocorrer a formação do tubo neural que termina no dia gestacional (DG) 10-11 em roedores. Neste mesmo período temos processos como neurogênese e subsequente migração celular ocorrendo. No segundo e terceiro trimestre vão ocorrer processos importantes como neurogênese, mielinização, sinaptogênese, poda sináptica em diferentes regiões do encéfalo,

essenciais para o seu desenvolvimento adequado (Figura 5) (ALMEIDA et al., 2020; CHINI; HANGANU-OPATZ, 2021).

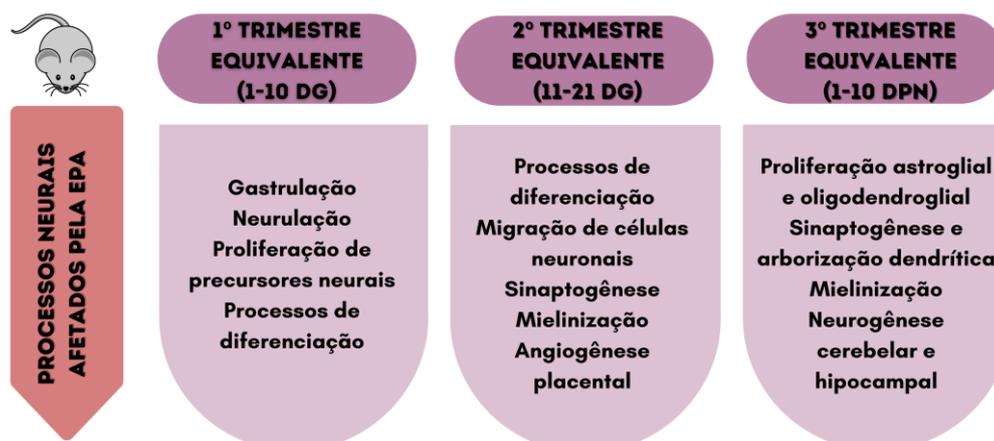
Figura 5: Representação esquemática do processo de neurodesenvolvimento em roedores e humanos.



Fonte: Adaptado de Shepanski et al, 2018

A EPA afeta especialmente processos críticos que ocorrem em cada uma dessas fases (Figura 6), que podem induzir perda neuronal grave, danos no córtex pré-frontal, hipocampo e regiões cerebelares.

Figura 6: Efeitos da exposição pré-natal ao álcool



Fonte: Adaptado de ALMEIDA et al., 2020.

O método de administração do etanol é uma outra variável nos modelos de TEAF e vão afetar o padrão de exposição ao álcool, quantidade de álcool ingerida, grau estresse. Nos modelos pré-natais o etanol é administrado na mãe, geralmente através do consumo voluntário, injeção intraperitoneal ou subcutânea, gavagem intragástrica ou inalação (Figura 7). No modelo pós-natal o etanol é administrado nos filhotes, geralmente por injeção intraperitoneal ou gavagem, sendo necessário o cuidado com a dosagem em razão da alta mortalidade. Cada método apresenta suas vantagens e desvantagens e deve ser utilizado de acordo com a necessidade experimental específica (PATTEN; FONTAINE; CHRISTIE, 2014).

Figura 7: Métodos de administração de etanol em roedores



Fonte: Adaptado de Patten et al, 2014

O nível de concentração de álcool sanguínea (CAS) é outro fator importante e vai variar de acordo com a dosagem, padrão de exposição, taxa metabólica, consumo de alimentos, tolerância e genética. Esse é um importante parâmetro para avaliar o padrão de consumo. Em modelos animais, CAS < 100 mg/dL é considerado um consumo baixo de álcool, CAS entre 100 e 200 mg/dL é um consumo moderado e mais que 200 mg/dL é um consumo elevado (ETHEN et al., 2009).

1.4 NEUROPLASTICIDADE

A neuroplasticidade é a capacidade do sistema nervoso de modificar sua organização anatômica e funcional frente a estímulos e experiências (ISMAIL; FATEMI; JOHNSTON, 2017). Existem dois tipos de neuroplasticidade, a funcional e a estrutural. A plasticidade funcional está envolvida com o fortalecimento/enfraquecimento e remodelamento das sinapses, como a potenciação de longa duração (LTP) e depressão de longa duração (LTD),

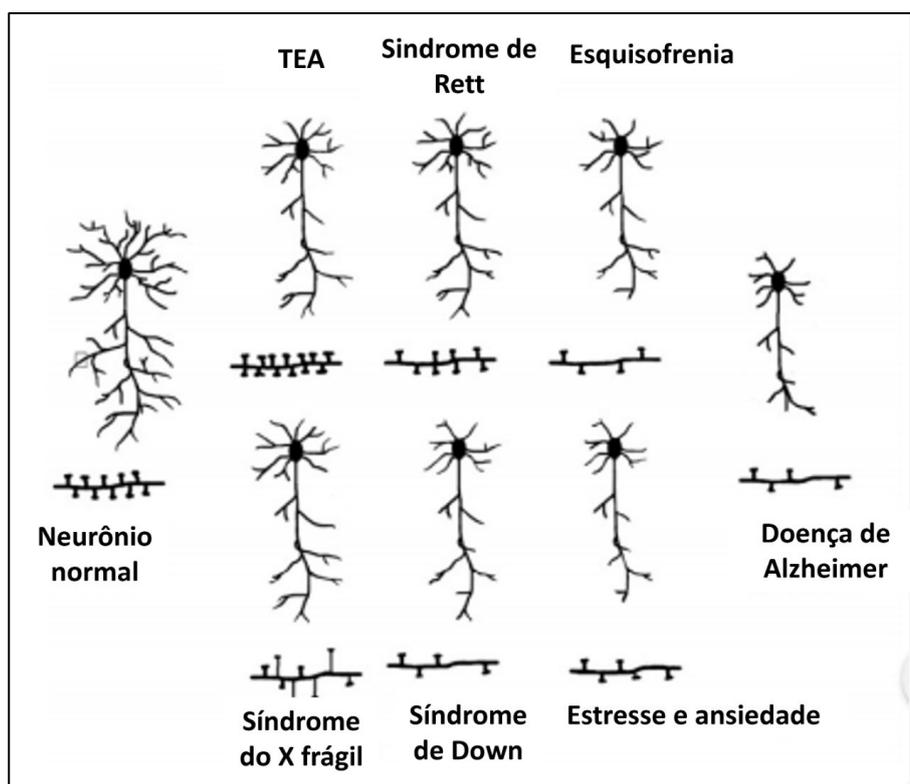
enquanto a plasticidade estrutural está envolvida no processo de neurogênese, alterações funcionais nas células neuronais, sinaptogênese, complexidade dendrítica, poda sináptica e morte neural (GAGE, 2004; NASCIMENTO-CASTRO et al., 2017).

A complexidade dendrítica é um tipo de plasticidade estrutural importante, pois o tamanho e a forma da arborização dos dendritos dos neurônios e seus espinhos determinam o número e a distribuição dos contatos sinápticos e o estabelecimento dos circuitos neurais. Durante o desenvolvimento, a arborização e a formação dos espinhos dendríticos são eventos dinâmicos, no entanto, algumas situações, ativação de moléculas podem estabilizar essas estruturas ou desestabilizar, enfraquecendo as sinapses. Dessa forma, a ramificação dendrítica e a formação e estabilização de sinapses desempenham papéis significativos na plasticidade estrutural e funcional do cérebro (BURKE; BARNES, 2006; KOLESKE, 2013).

Alterações nos padrões de ramificações dendríticas, tais como, perda ou retração da arborização e mudanças na morfologia ou número de espinhos dendríticos contribuem para vários distúrbios neurológicos e do neurodesenvolvimento, como o transtorno do espectro autista, esquizofrenia, Síndrome de Down, Síndrome do X frágil, Síndrome de Rett (Figura 8). A falha na comunicação entre os neurônios afeta diretamente processos cognitivos e psicológicos (KULKARNI; FIRESTEIN, 2012; PENZES et al., 2011). Alguns estudos já demonstraram que a EPA provoca alterações nos espinhos dendríticos (DE GIORGIO; GRANATO, 2015; TARELO-ACUÑA; OLVERA-CORTÉS; GONZÁLEZ-BURGOS, 2000). Inclusive trabalhos prévios do nosso grupo demonstraram que a exposição ao álcool durante o terceiro trimestre

equivalente aumenta o tamanho e a arborização dentrítica no GD de ratos adolescentes (BIANCO et al., 2021).

Figura 8: Atrofias na morfologia da arborização e espinhos dendríticos em doenças associadas ao SNC



Fonte: Adaptado de Kulkarni, V.A., et al, 2012.

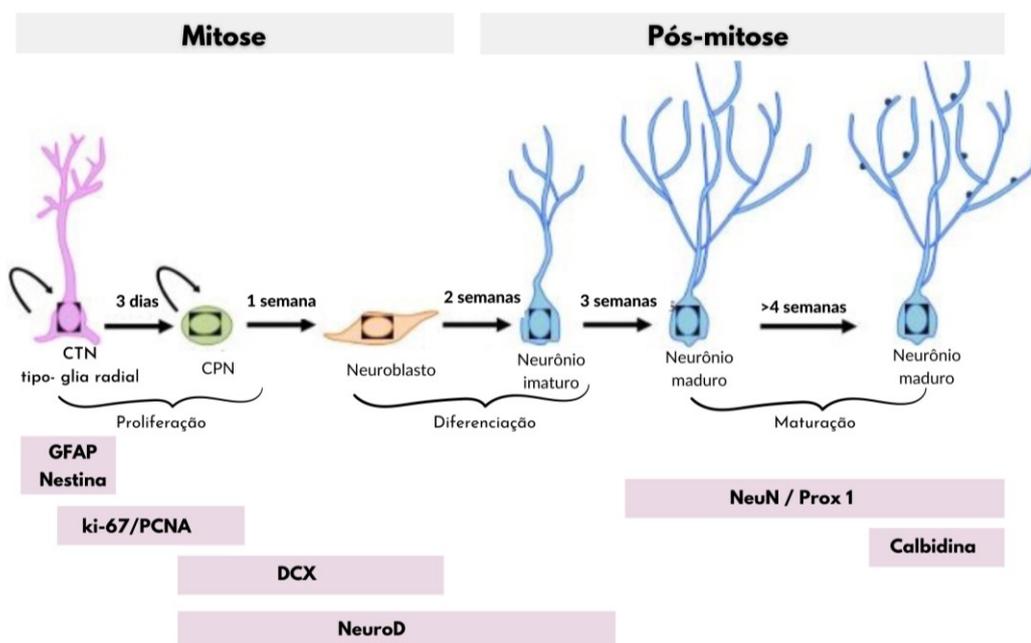
A neurogênese é a capacidade de gerar novos neurônios funcionais é uma forma de neuroplasticidade estrutural. Em mamíferos, após o nascimento, é encontrada principalmente em duas regiões: (a) zona subgranular (ZSG) na região do giro denteado (GD) no hipocampo em que progenitores neurais geram neurônios glutamatérgicos; (b) zona subventricular dos ventrículos laterais, onde os progenitores neurais dão origem às células que migram para o bulbo olfatório antes de diferenciarem (FARES et al., 2019). A neurogênese também foi relatada

no hipotálamo e no tronco cerebral, e pode existir no neocórtex, corpo estriado, amígdala e substância negra de roedores e outros mamíferos, no entanto, ainda são estudos controversos (DENOTH-LIPPUNER; JESSBERGER, 2021).

A neurogênese adulta pode ser dividida em quatro fases: uma fase celular precursora, que serve para a expansão do conjunto de células que podem se diferenciar em neurônios, uma fase inicial de sobrevivência, que marca a saída do ciclo celular, uma fase de maturação pós-mitótica, que está associada ao estabelecimento de conexões funcionais, crescimento de axônios e dendritos e sinaptogênese e uma fase tardia de sobrevivência, representando um ajuste fino (GONÇALVES; SCHAFER; GAGE, 2016; KUHN; TODA; GAGE, 2018).

O início da neurogênese começa com a célula precursora semelhante à glia radial em que o corpo celular se encontra na camada subventricular no ventrículo ou na subgranular no GD e estende-se até a camada molecular, esta célula progride ao longo de três estágios progenitores (tipo 1, tipo 2a/tipo 2b e tipo 3). Essa fase está associada a uma alta taxa proliferativa e alguns marcadores celulares podem ajudar a identificar as células que se encontram nessa fase, como GFAP, Sox 3, Ki-67, Nestina. Em seguida a célula vai para uma fase de diferenciação e maturação celular, com a extensão de axônio e dendritos, aumentando a plasticidade sináptica, nesse momento, são utilizados marcadores como doublecortina (DCX), NeuN, NeuroD, Calbidin (Figura 9). O ciclo finaliza com a existência de uma nova célula granular (KEMPERMANN; SONG; GAGE, 2015).

Figura 9: Estágios de desenvolvimento da neurogênese no hipocampo adulto.



PCNA, antígeno nuclear de proliferação celular; GFAP, proteína ácida fibrilar glial;

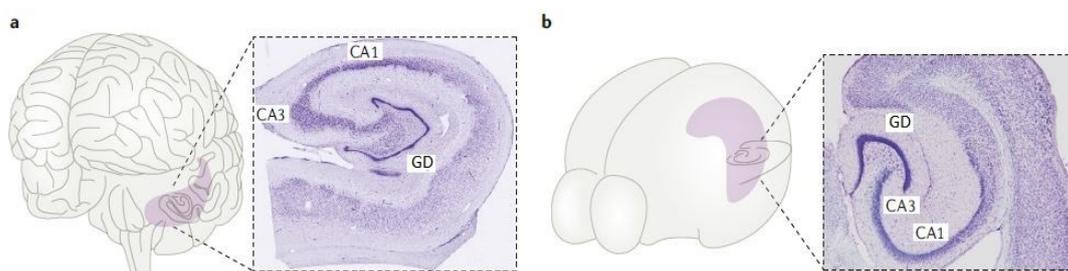
DCX, doublecortina. Fonte: Adaptado de Niklison-Chirou, *et al*, 2020.

1.4.1 Formação Hipocampal

É uma região que faz parte do sistema límbico e está relacionada com a cognição, em especial aspectos de aprendizado e memória. O hipocampo propriamente dito é denominado Cornu Ammonis (CA) e é usualmente dividido em campos corticais: CA1, CA2, CA3 e CA4, sendo essa divisão baseada na morfologia dos neurônios (Figura 10) (TATU; VUILLIER, 2014). O GD faz parte da formação hipocampal e consiste em três camadas: a camada molecular, com projeções de neurônios da camada granular, sendo neurônios glutamatérgicos; a camada granular contendo células granulares e o hilus, que contém células

musgosas, em cesto e interneurônios (DOMÍNGUEZ-RIVAS et al., 2021). A zona subgranular (ZSG) é considerada um nicho neurogênico em que as células progenitoras neurais residem. É a região onde ocorre proliferação, diferenciação e maturação dos neurônios (HAINMUELLER; BARTOS, 2020).

Figura 10: Organização anatômica do hipocampo



a-Encéfalo humano e corte seccional do hipocampo b-Encéfalo de rato no mesmo corte. Fonte: Adaptado de Hainmueller T. *et al*, 2020.

1.4.2. Alterações da neuroplasticidade hipocampal ocasionada pela exposição ao álcool durante o desenvolvimento

A EPA causa efeitos a longo prazo na modulação da neuroplasticidade hipocampal (PUGLIA; VALENZUELA, 2010). Por exemplo, pode-se citar a diminuição da neurogênese hipocampal em animais adultos que foram expostos ao álcool durante o desenvolvimento (GIL-MOHAPEL et al., 2011) e alterações em proteínas sinápticas (BRADY et al., 2013) e na arborização dendrítica (GOEKE et al., 2018, BIANCO et al 2021) são alguns exemplos. No entanto, alguns estudos mostraram que a proliferação de células no hipocampo não é afetada pela exposição pré/pós-natal ao álcool em animais adolescentes

(HELPER et al., 2009). Por outro lado, o número de neurônios maduros está significativamente diminuído em ratos adolescentes, sugerindo que os precursores neuronais podem ser vulneráveis nesse momento de vida (GIL-MOHAPPEL et al., 2011; KLINTSOVA et al., 2007).

Alguns estudos apresentam resultados discrepantes, pois os déficits observados são dependentes da dose de etanol administrada, o tempo da exposição ao álcool (pré/pós-natal), a concentração de álcool sanguínea (CAS), o modelo de animal utilizado, a idade da prole no momento da análise (GIL-MOHAPPEL et al., 2010). Em contrapartida, a exposição pré-natal ao álcool combinado com estresse materno apresentou diminuição na neurogênese hipocampal a longo prazo (13 meses de idade) (GIL-MOHAPPEL et al., 2014).

Estudos prévios encontraram aumento na complexidade dendrítica apical, indicando que a exposição pós-natal ao álcool (terceiro trimestre equivalente) induz uma maturação prematura dos neurônios piramidais hipocampais, que pode levar a uma restrição prematura da neuroplasticidade (GOEKE et al., 2018, BIANCO et al 2021). A EPA também pode prejudicar a plasticidade sináptica hipocampal, com redução na potenciação de longa duração (LTP) na região do GD em animais adolescentes e adultos (PATTEN et al., 2013; TITTERNESS; CHRISTIE, 2012).

1.5 ESTRESSE PRECOCE

As experiências no início da vida representam uma grande influência em aspectos comportamentais, psicológicos, neurais das crianças e produzem efeitos que podem perdurar por longos períodos, incluindo a vida adulta. A

primeira infância e infância são considerados períodos críticos e importantes para o desenvolvimento, visto que são períodos de intensa neuroplasticidade. Essa neuroplasticidade pode ser muito benéfica para o aprendizado, mas experiências negativas também podem ser críticas para o desenvolvimento (POLLAK, 2005; SMITH; POLLAK, 2020).

O termo estresse se refere a resposta psicológica desencadeada quando o indivíduo se percebe sob ameaça ou desafiado, gerando uma série de mudanças fisiológicas e comportamentais. A constante ativação desse sistema de forma crônica pode levar a desregulações importantes em aspectos comportamentais e psicológicos. Nesse contexto, o termo estresse precoce ou *Early life stress* (ELS) se refere ao estresse sofrido por crianças na primeira infância, que pode abranger aspectos de restrição nutricional, exposição a toxinas, negligência, abandono, abuso, estrutura familiar prejudicada (HERZBERG; GUNNAR, 2020).

O estresse no início da vida prejudica a regulação do feedback do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA), elevando os níveis do hormônio redutor da corticotrofina (CRH), glicocorticoides e alterações no sistema nervoso autônomo. Esses circuitos estão envolvidos no processamento das emoções, memória e aprendizagem (NISHI, 2020).

1.5.1 Estresse precoce como agravante da exposição ao álcool durante o desenvolvimento

Crianças que foram expostas ao álcool no início da vida, podem estar mais propensas a vivenciarem experiências estressantes no período pós-natal, seja

por negligência, abuso e ou abandono infantil. O abuso de álcool materno foi identificado como uma das principais razões para institucionalização de crianças em orfanatos (LANGE et al., 2013). A separação materna (SM) é um modelo utilizado em roedores, de estresse no início da vida que prejudica a regulação da resposta do eixo HHA afetando regiões do córtex pré-frontal e hipocampo. Nas primeiras semanas de vida a interação mãe e filhote é de extrema importância para a sobrevivências dos mesmos, sendo responsável pela manutenção da temperatura corporal, desenvolvimento dos sentidos e fonte de alimento (BERGMAN, 2019).

A desregulação do eixo HHA está associada à transtornos emocionais, como depressão e ansiedade, que podem perdurar durante a vida adulta (CHEN; BARAM, 2016). As consequências do protocolo de SM dependem do estágio de desenvolvimento, duração da separação (15min a 24h), número de dias (1 a 21 dias) e da experiência da separação, realizando a retirada da mãe ou dos filhotes. Os filhotes que passam por alguma alteração no contato com a mãe nesse período de amamentação, apresenta, em sua maioria, mudanças comportamentais nos estágios seguintes de vida. Alguns estudos sugerem que a SM aumenta o comportamento do tipo-ansioso e do tipo-depressivo nos animais adultos (HUOT et al., 2004; NISHI, 2020).

Alguns efeitos observados em animais expostos precocemente ao álcool foram acentuados com o estresse precoce, como é o caso da hipoatividade e déficits no aprendizado (SWART; RUSSELL; DIMATELIS, 2019). Além de um aumento no comportamento do tipo ansioso (BIGGIO et al., 2018).

1.5.2. Comportamento de frustração e a EPA

A EPA tem sido relatada por impactar negativamente em aspectos comportamentais e cognitivos nas crianças e nos estágios seguintes da vida. Dentre os aspectos relatos incluem prejuízos na atenção, aprendizado, memória, deficiências intelectuais, ansiedade, depressão e dificuldade para lidar com frustração (SUBBANNA; BASAVARAJAPPA, 2022).

O sistema de recompensa mediado pelo sistema mesolímbico é composto por estruturas cerebrais responsáveis pelo processamento fisiológico e cognitivo da recompensa. A recompensa é um processo no qual o encéfalo associa estímulos a um resultado positivo, que resulta em ajustes comportamentais para buscar novamente aquele resultado positivo. A ausência desses reforçadores pode levar a mudanças comportamentais e/ou emocionais (MICHAELSEN; ESCH, 2021; SOSA; GIOCOMO, 2022). Os mamíferos podem responder a uma omissão ou redução inesperada de recompensa com uma variedade de respostas comportamentais. Em humanos já foram descritas respostas como raiva, choro, esquiva, agitação e/ou a frustração (KELLER; NESSE, 2005).

Os modelos experimentais em roedores para o estudo da frustração tiveram início na década de 50 com Amsel e Rousel (1952) que realizaram um experimento utilizando ratos em pistas duplas de corrida para explicar os efeitos da omissão de reforço (EOR). O que notou foi um aumento na resposta instrumental (velocidade de corrida) desses animais após a omissão inesperada, que foi interpretado como uma resposta emocional de frustração.(AMSEL; ROUSSEL, 1952)

As omissões de reforço podem ser eliminação completa, parcial ou redução na qualidade do reforço. Isso é importante pois os efeitos da EOR

parecem depender da magnitude do reforço, se são altamente ou fracamente reforçadoras (JUDICE-DAHER et al., 2011). Dentre esses estímulos temos a ingestão de um alimento palatável. A ingestão de um alimento não envolve apenas sinais fisiológicos, mas também de característica hedônicas, em roedores podemos observar esse comportamento pela preferência em soluções de sacarose, sendo utilizada como medida comportamental de anedonia (SCHEGGI; DE MONTIS; GAMBARANA, 2018).

Uma teoria dos mecanismos de saliência separa a recompensa em dois processos distintos, o “*wanting*” é caracterizado e gerado pelos circuitos mesolímbicos do encéfalo na forma de motivação e “*liking*” refere-se ao componente hedônico ou prazeroso da recompensa e parece ser controlado por circuitos que empregam opióides e canabinóides endógenos, além de Ácido Gama-Aminobutírico (GABA) como neurotransmissores (MORALES; BERRIDGE, 2020).

Um estudo de metanálise mostrou que o uso do álcool aumenta a agressividade em função da frustração (ITO; MILLER; POLLOCK, 2004). Os estudos relacionando a EPA e a frustração ainda são escassos. No entanto, já foi visto que a EPA pode resultar em alterações comportamentais ao longo da vida. Adolescentes com TEAF apresentam muitos comportamentos de risco, incluindo problemas com a lei, experiência escolar interrompida e comportamento desadaptativo e os fatores relacionados com esses comportamentos de alto risco estão relacionados com déficits no funcionamento executivo, tomada de decisão prejudicada (RASMUSSEN; WYPER, 2007). O estudo de Connor e colaboradores viu que a exposição precoce ao álcool estava relacionada com o afeto negativo da criança relacionados ao baixo nível de

suporte emocional. No entanto quando as mães dessas crianças forneciam apoio, elas eram capazes de ter um melhor enfrentamento da frustração (O'CONNOR; KOGAN; FINDLAY, 2002).

1.6 TRATAMENTO PARA O TRANSTORNO DO ESPECTRO ALCOÓLICO FETAL

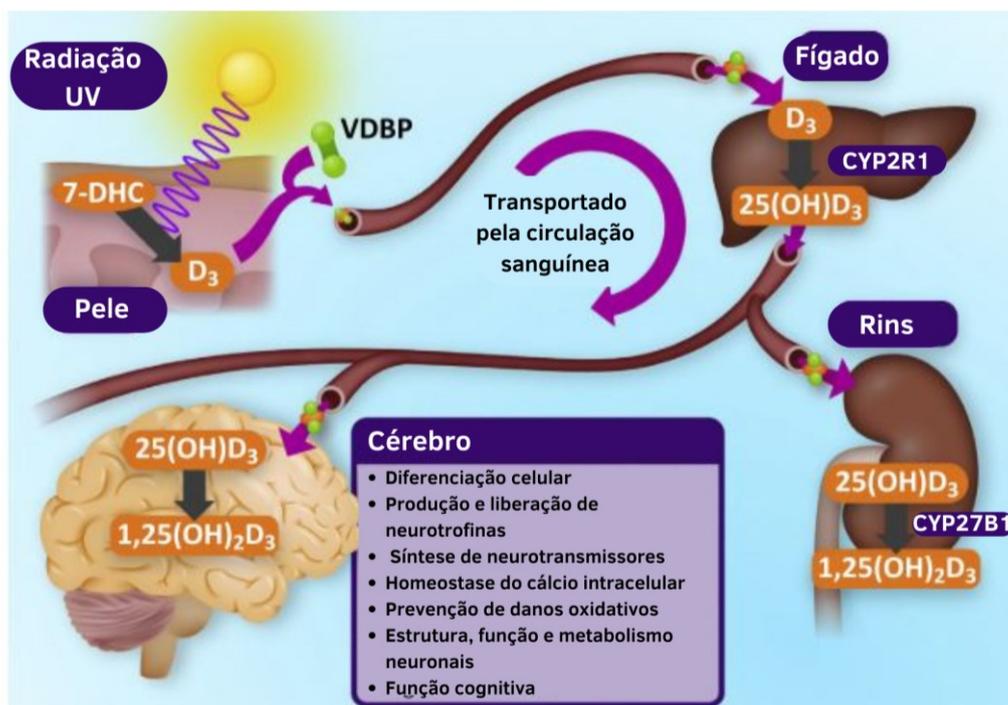
Atualmente não existe cura para o TEAF e o método mais eficaz de prevenção é a abstinência total de álcool durante toda a gestação. Muitos estudos sobre métodos pré-natais para reverter ou prevenir os efeitos do álcool estão sendo explorados, no entanto, nenhum deles está aprovado para uso clínico (GUPTA et al., 2016; WOZNIAK; RILEY; CHARNESS, 2019). O diagnóstico preciso do TEAF é muito difícil e as vezes tardio, e normalmente caracterizam como uma criança com desenvolvimento cognitivo e comportamental prejudicados, ou uma criança "problema" (HELGESSION et al., 2018). Esses efeitos prejudicam a vida desses indivíduos. Além disso, os pais também se sentem sobrecarregados e experimentam a falta de conhecimento, diagnóstico, compreensão e apoio de alguns profissionais de saúde. Sendo de extrema importância a busca por tratamentos efetivos (SANDERS; BUCK, 2010).

1.7 VITAMINA D

A vitamina D (colecalfiferol) considerada um hormônio endócrino, é obtida em humanos através da alimentação ou da radiação solar (HANEL; CARLBERG, 2020). E nos roedores é obtida pela alimentação. Tanto a vitamina D quanto as enzimas necessárias para o seu metabolismo são encontradas no encéfalo (EYLES; BURNE; MCGRATH, 2013).

A enzima 7-desidrocolesterol redutase que está envolvida na última etapa da síntese do colesterol inicia a quebra do anel do 7-desidrocolesterol (7-DHC) quando esse é exposto a radiação UVB para formar a pré-vitamina D₃, que sofre isomerização em vitamina D₃. Em seguida essa vitamina D₃ sofre duas hidroxilações, principalmente no fígado, pela ação da enzima CYP2R1, gerando a 25(OH) D₃. A ação renal da CYP27B1 gera o metabólito ativo da vitamina D, o calcitriol (1,25 (OH)₂ D₃). E o catabolismo proveniente da ação da CYP24A1 gera o metabólito 24,25 (OH)₂ D₃ (Figura 11) (HORST; REINHARDT; REDDY, 2005).

Figura 11: Metabolismo vitamina D no fígado e rins



Fonte: Adaptado de Mayne, P.E. et al, 2019.

A proteína ligadora de vitamina D (VDBP- *vitamina D binding protein*) é a principal proteína de transporte para os metabólitos da vitamina D na corrente

sanguínea. Para a maioria das células, no entanto, é a forma não ligada ou livre de 25-hidroxivitamina D (25(OH) D₃) que entra nas células, enquanto em alguns tecidos, como os rins e provavelmente também a glândula paratireoide e a placenta, a VDBP com seu 25(OH) D₃ ligado entra na célula através do complexo megalina-cubilina. Uma vez na célula, a proteína de choque térmico de 70kD (HSP70) funciona como um transporte intracelular primeiro descarregando 25(OH)D₃ da VDBP, movendo-o para as mitocôndrias para o metabolismo de 1,25(OH)₂D₃, e posteriormente facilitando o movimento de 1,25(OH)₂D₃ no núcleo para ligação ao receptor de vitamina D (VDR) (BIKLE; CHRISTAKOS, 2020).

O VDR é da família dos receptores nucleares, é responsável pela distribuição da Vitamina D nos tecidos. Ele foi inicialmente identificado no intestino e em locais envolvidos com a homeostase do cálcio. No entanto, atualmente já foi identificado em diversos locais não envolvidos com a homeostase do cálcio, como cérebro, pâncreas, mama, hipófise, entre outros (WRZOSEK et al., 2013). Isso sugere que a vitamina D está envolvida em diversos processos além do cálcio. E a presença do VDR já foi detectada em diferentes regiões no encéfalo : córtex; amígdala; tálamo; hipocampo e substância nigra (BIVONA et al., 2019).

1.7.1 Atuação da Vitamina D no SNC

Algumas evidências sugerem que a vitamina D está envolvida no processo de plasticidade sináptica (EYLES et al., 2005). Foi demonstrado que a deficiência pré-natal de vitamina D altera genes envolvidos na plasticidade

sináptica, como Drebrina e Neuromodulina (ALMERAS et al., 2007) e exerce influência em processos de proliferação e diferenciação neuronal (DE ALMEIDA, 2017). A suplementação demonstrou regular positivamente a sinaptojanina 1 e a sinaptotagmina 2 e a proteína quinase dependente de cálcio/calmodulina II α (CaMKII α), ambos envolvidos também na plasticidade sináptica (MAYNE; BURNE, 2019). Além disso, a suplementação demonstrou aumentar os receptores para vários neurotransmissores importantes, incluindo dopamina, glutamato e serotonina, que são necessários para o funcionamento sináptico normal (LATIMER et al., 2014).

A deficiência da vitamina D durante a gestação tem efeitos negativos no desenvolvimento do encéfalo levando a diminuição da proliferação celular e do volume cerebral (EYLES et al., 2003). Durante a gravidez é comum ocorrer diminuição nos níveis de vitamina D (HOLLIS, 2007). E além disso, a exposição ao álcool também pode ocasionar diminuição nos níveis séricos dessa vitamina (MANARI; PREEDY; PETERS, 2003). Sendo assim, quantidades reduzidas de vitamina D podem contribuir com os sintomas cognitivos produzidos pelo TEAF (MILNE; BARAN, 1985). Ainda, alguns estudos demonstraram que a vitamina D possui atividade neuroprotetora, como a inibição da produção de óxido nítrico, reduzindo os níveis tóxicos de cálcio no encéfalo (HERSCOVITCH; DAULETBAEV; LANDS, 2014), diminuição da neuroinflamação, excitotoxicidade glutamatérgica (LAWRENCE; SHARMA, 2016) e também está relacionada com a melhora cognitiva relacionada à idade, como processos de aprendizagem e memória dependentes do hipocampo (LATIMER et al., 2014).

Já foi relatado que a deficiência, pré-natal e/ou na primeira infância, da vitamina D está relacionada com o risco aumentado de doenças do

neurodesenvolvimento, como esquizofrenia (CUI et al., 2021), transtorno do espectro autista (FERNELL et al., 2015). Além disso, está relacionada com doenças do humor como depressão e ansiedade (BERRIDGE, 2017), transtorno do déficit de atenção e hiperatividade (GAN et al., 2019) e transtorno bipolar (CEREDA et al., 2021).

2 HIPÓTESE EXPERIMENTAL

A EPA vai apresentar um efeito combinado ao estresse precoce, prejudicando a neurogênese hipocampal e diminuindo a motivação nos animais, que pode estar relacionado com os déficits cognitivos apresentados no TEAF e a vitamina D com sua atividade neuroprotetora e efeitos cognitivos positivos, poderá inibir esses efeitos deletérios no hipocampo.

3 JUSTIFICATIVA

Considerando a relevância clínica de estudar a associação entre a EPA ao estresse precoce e o fato de que atualmente não existe tratamento para o TEAF, o estudo de possíveis intervenções terapêuticas a fim de atenuar os efeitos deletérios e proporcionar qualidade de vida aos indivíduos acometidos se justifica.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Investigar os efeitos da vitamina D no comportamento e na neuroplasticidade hipocampal em animais expostos precocemente ao álcool e ao estresse da SM.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar os efeitos da Vitamina D na EPA no período equivalente ao terceiro trimestre em humanos e/ou o estresse precoce por SM em ratos adolescentes:

- Avaliação dos comportamentos motivacionais;
- Na diferenciação neuronal no hipocampo;
- Na morfologia e arborização dendrítica de neurônios hipocampais.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados os encéfalos coletados pela mestra Claudia Bianco durante a dissertação de mestrado no PPG em Neurociências. Portanto, os itens 5.1, 5.2 e 5.3 foram realizados por ela, sendo que o meu trabalho começou com o processamento das amostras para as imunohistoquímica, avaliação da arborização dendrítica e análise comportamental usando vídeos dos testes gravados previamente.

5.1 ANIMAIS

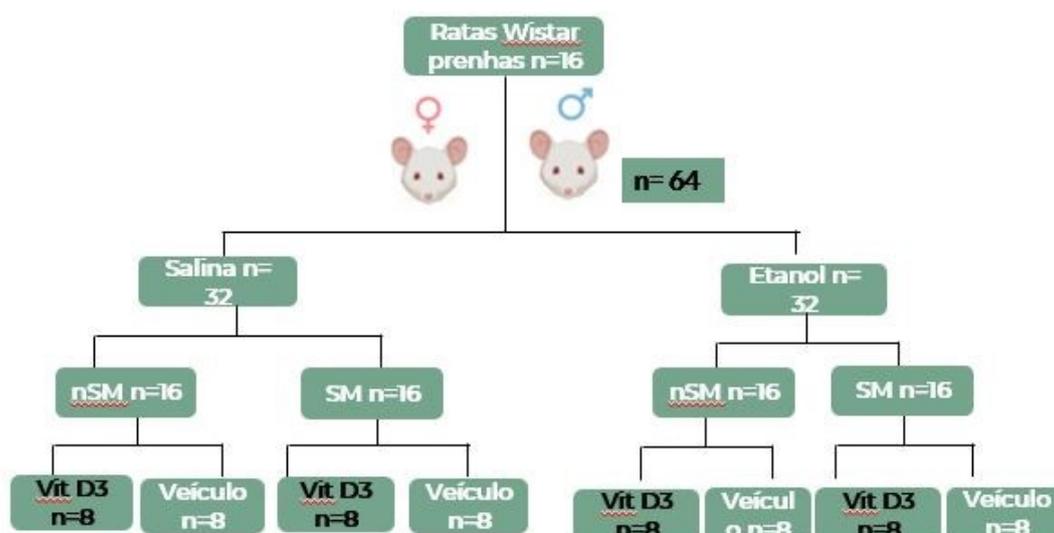
Foram utilizados 64 ratos Wistar, com 45 dias de idade, provenientes de 16 ratas Wistar prenhas, fornecidas pelo Biotério Central da UFSC. As ratas prenhas foram mantidas em duplas até o dia gestacional 18, quando foram alojadas individualmente. No dia pós-natal (DPN) 21, as ninhadas foram desmamadas e separadas por sexo, com o máximo de 5 animais por caixa. As mães e seus filhotes foram mantidos caixas plásticas opacas (41 X 34 X 16 cm) a $20^{\circ}\text{C} \pm 22^{\circ}\text{C}$ com livre acesso a água e comida, em ciclo claro/escuro 12:12 h (07:00-19:00h). Todas as manipulações foram realizadas entre às 9:00 e 17:00 h. Os animais tiveram livre acesso à ração comercial para ratos NUVITAL – Nuvilab CR1 e a água filtrada e potável. O dia do nascimento dos filhotes foi considerado dia pós-natal 0 (DPN0). Todos os procedimentos realizados foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFSC (CEUA) - Protocolo 6980201116.

5.2 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

No DPN 2, 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 etanol (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 D (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 1.

Figura 12: Representação esquemática dos grupos experimentais



Fonte: Autoria própria

O dia do nascimento foi considerado DPN 0 e a SM aconteceu do DPN 2 ao DPN 14 (3 horas diárias). A exposição ao álcool ocorreu nos dias 4, 6, 8 e 10. O tratamento com a vitamina D₃ ocorreu entre os dias 22 e 37 em humanos esta janela temporal corresponde ao período da infância (entre 6 e 11 anos) (SENGUPTA, 2013).

No DPN 46 os animais foram eutanasiados por perfusão cardíaca com paraformaldeído 4% e os encéfalos coletados para futuras análises.

5.2.1 Protocolo de exposição precoce ao álcool

Do DPN 4 ao DPN 10, período que corresponde ao 3º trimestre equivalente em humano, os filhotes do grupo EtOH foram injetados intraperitonealmente (i.p.) com 5g/Kg de etanol (25% em solução salina) em dias alternados, para mimetizar o consumo de álcool excessivo em humanos. Um volume equivalente de solução salina foi injetado via i.p. nos filhotes do grupo Controle (salina) (FILGUEIRAS; KRAHE; MEDINA, 2011; MEDINA; KRAHE; RAMOA, 2005). A concentração de álcool sanguínea (CAS) média neste modelo é de 239 mg/dL, sendo considerado um alto nível de álcool (FILGUEIRAS; KRAHE; MEDINA, 2011).

5.2.2 Protocolo por separação materna

As ninhadas inteiras foram escolhidas aleatoriamente e foram submetidas ao protocolo da SM (SM, n = 40) de DPN 2 a DPN 14 por 3 h / dia (09: 00-12: 00), enquanto as ninhadas do grupo controle não foram separadas da mãe (nSM, n = 40). Os filhotes do grupo SM foram cuidadosamente removidos de sua gaiola e colocados em uma gaiola limpa e foram levados para uma outra sala aquecida (± 25 °C) para evitar a comunicação entre os filhotes e a mãe. Após 3h, os filhotes foram devolvidos à sua gaiola junto da mãe (Adaptado de SWART; RUSSELL; DIMATELIS, 2019).

5.2.3 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 D (colecalfiferol) (Webber Naturals Pharmaceuticals), forma precursora do metabólito biologicamente ativo, 1,25-di-hidroxivitamina 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).

5.3 AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL

5.3.1 Análises motivacionais

O comportamento alimentar induzido por alimentos palatáveis em animais não privados de alimentos pode ser usado para avaliar a resposta motivacional a estímulos hedônicos naturais porque o alimento adoçado atua como um reforçador natural. Um déficit em qualquer aspecto do processo de recompensa pode resultar em comportamento que pode ser interpretado como anedonia (SCHEGGI; DE MONTIS; GAMBARANA, 2018). Entre esses aspectos estão a incapacidade de sentir prazer; a expectativa de prazer; a avaliação da recompensa, a determinação do esforço necessário para obter a recompensa; planejar e decidir a melhor estratégia para repetir a experiência prazerosa; diminuição da interação social; comportamento submisso; evitação social; derrota social; desespero e ansiedade (BARBOSA, T.S, et al, 2017).

- a) Ingestão de alimentos palatáveis em ratos não privados de alimentos: o comportamento protocolo oral foi baseado na dissertação de mestrado de Barbosa e colaboradores. (dados não publicados) e foi realizado no DPN

41-43 (n=8 animais/grupo). Na semana anterior ao teste, foi disponibilizado alimento palatável (aproximadamente 3 g de Nescau Ball Cereal© por animal/dia) na gaiola-moradia dos animais. O aparato utilizado para este teste foi uma arena circular com um alimentador central de plástico contendo esferas de vidro. Cada animal passou por duas fases experimentais separadas por 24 h de intervalo: (i) Adaptação (três exposições de 5 min ao aparato) e (ii) Teste (três exposições de 5 min ao aparato e comedouro com 10 unidades de Nescau *ball* cereal© meio enterrada entre as esferas de vidro). A latência para iniciar a alimentação, o tempo de alimentação e a quantidade de alimento palatável consumido foram registrados.

- b) Teste de Frustração: Após 24h da exposição ao alimento palatável no teste anterior, cada animal foi novamente exposto ao aparato e comedouro em um intervalo de 5min, contendo apenas as esferas plásticas, sem as unidades de Nescau *ball*. Os aspectos analisados foram número de entradas no comedouro, latência para explorar o comedouro e tempo explorando o comedouro.

5.4 AVALIAÇÃO POR IMUNOHISTOQUÍMICA

5.4.1 Processamento do tecido encefálico

Aos 46 dias de idade, os animais foram anestesiados intraperitonealmente (i.p.) com cetamina (100 mg/Kg,) e xilazina (10 mg/Kg) e perfundidos com solução salina 0,9%, seguida de paraformaldeído (PF) 4%. Os encéfalos foram removidos da calota craniana e ficaram por 12h em solução de PF 4%, e depois foram colocados em solução de sacarose a 30%. Após a saturação, cortes seriados de 30µm de espessura

foram feitos utilizando o vibratomo (Vibratomo, Series 1000, St. Louis, MO, USA), as fatias foram cortadas entre as coordenadas do Bregma 2,52 anterior até 6,12 posterior. As fatias foram coletadas em 1/6 séries e mantidas em solução de PBS (salina tamponada de fosfato) com azida 0,5%.

5.4.2 Imunomarcção para diferenciação celular

Uma série de cortes seriados contendo o hipocampo foi processada para o marcador doublecortina (DCX), uma proteína associada a microtúbulos expressa por neuroblastos, sendo considerada um marcador de neurogênese (AYANLAJA et al., 2017; BROWN et al., 2003). Após o bloqueio com a solução de 3% H₂O₂/10% metanol em TBS 0,1 M por 15 min e pré-incubação com soro de cavalo 5% por 1 h, os cortes foram incubados por 48 h a 4 °C com o anticorpo de cabra policlonal anti-DCX (1:400; c-18, Santa Cruz Biotechnology). Os cortes foram incubados por 2h com anticorpo secundário de cavalo anti-cabra (biotina-conjugado IgG, 1:200; Vector Laboratories). Depois de lavados em PBS 0,1M as células marcadas com os anticorpos foram visualizados utilizando um sistema complexo avidina-biotina-peroxidase (Vectastain ABC Elite Kit, Vector Laboratories), por 1 hora, com 3,3'-diaminobenzidina (DAB; Vector Laboratories) como cromógeno, por cerca de 3 min. Após as fatias foram montadas em lâminas gelatinizadas (revestidas de gelatina 2%), posteriormente desidratadas e diafanizadas em xilol (Synth, Diadema, SP, Brasil) e cobertas com lamínula fixada com meio de montagem para microscopia Entellan (Merk, USA).

5.5 AVALIAÇÃO DA ARBORIZAÇÃO DENDRÍTICA

5.5.1 Processamento do encéfalo para a impregnação com Golgi

Com o objetivo de avaliar a arborização dendrítica na região do GD do hipocampo, um grupo de animais foram submetidos a perfusão, conforme 5.3.1 e os encéfalos foram removidos da calota craniana e transferidos para 20 mL de solução Golgi (uma solução a base de cloreto de mercúrio), onde os encéfalos permaneceram durante 15 dias para impregnação e marcação neuronal, conforme a técnica de Golgi (KANNANGARA et al., 2014; RISHER et al., 2014). Posteriormente, os encéfalos foram transferidos para solução de sacarose 30%. Na sequência, foi realizado cortes encefálicos coronais seriados com espessura de 200 μm utilizando o vibratomo (Vibratome, Series 1000, St. Louis, MO, USA). As fatias foram coletadas e submetidas a uma câmara úmida por 48 horas para posterior processo de desidratação e análise microscópica, todas as amostras foram manuseadas no escuro.

5.5.2 Análise de Sholl

A quantificação do número e comprimento das ramificações dos neurônios granulares do GD foi avaliada usando a análise de Sholl, esses parâmetros foram obtidos analisando as ramificações contidas dentro de intervalos concêntricos de 10 μm (GENSEL et al., 2010). Tendo o centro do soma como ponto de referência, foram analisados o número de intersecções por raio, a média do número total de intersecções e o comprimento do dendrito (distância máxima do soma até o final dos dendritos). Foram selecionados aleatoriamente de cada animal 5 neurônios localizados no GD da formação hipocampal, para cada grupo experimental (n=3). Os

neurônios com menores sobreposições com outros neurônios e com o maior número de ramificações dendríticas visíveis foram selecionados para análise. As fatias foram analisadas utilizando um microscópio Microscópio Invertido IX43 com uma ampliação de 40 x. Para análise de Sholl foi utilizado o plugin Simple Neurite Tracer do software Image J (FERREIRA et al., 2014), em que os dendritos dos neurônios foram manualmente traçados e analisados. criando circunferências a partir do centro do soma e obtendo uma representação em 3D do neurônio traçado, possibilitando obter a quantificação e comprimento dos prolongamentos e a intersecção deles com as circunferências geradas.

5.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os gráficos foram realizados pelo programa GraphPad Prism 8.0 e os resultados obtidos foram avaliados no programa Statistica 7.0 analytical software (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA) por análise de variância (ANOVA) multifatorial seguido pelo teste *post-hoc* de Duncan, quando apropriado. O valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

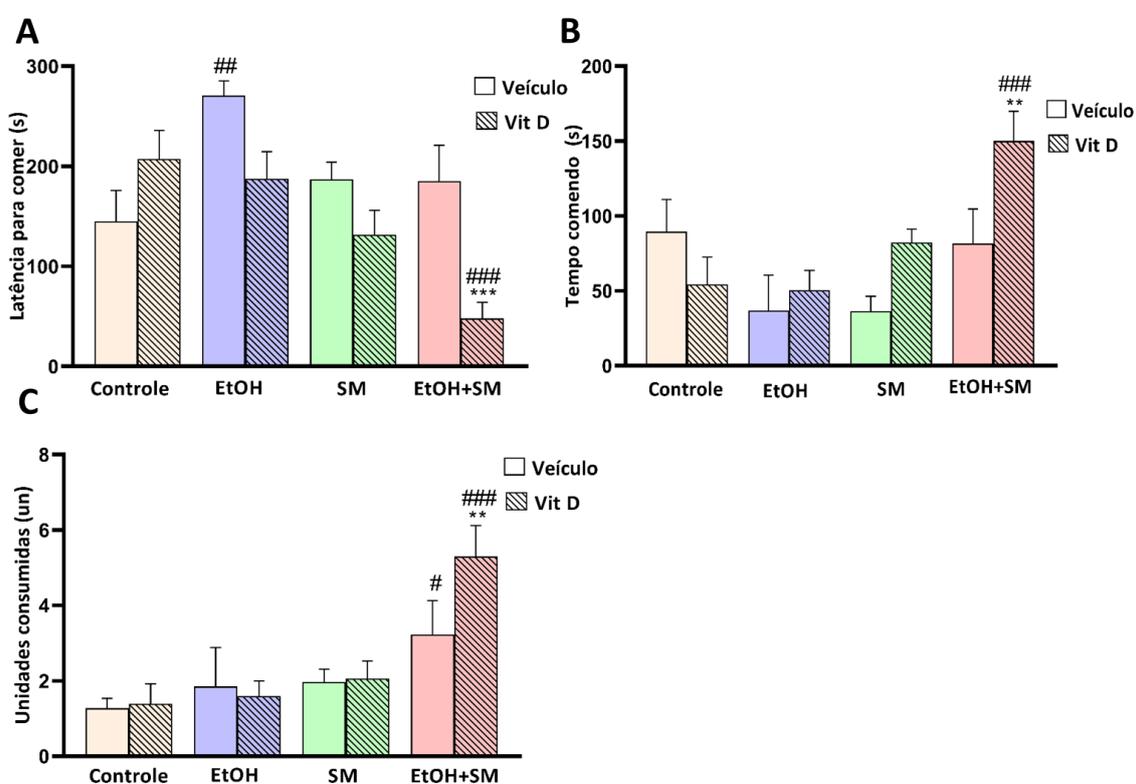
6 RESULTADOS

6.1 EFEITOS DA VITAMINA D SOBRE A INGESTÃO DE ALIMENTO PALATÁVEL EM ANIMAIS NÃO PRIVADOS DE ALIMENTO

Com a finalidade de avaliar os efeitos da vitamina D sobre a motivação dos animais expostos ao álcool e estresse foi realizado o teste comportamental de ingestão de alimento palatável em animais não privados de alimento. Foi realizada uma ANOVA multifatorial que revelou no parâmetro latência para comer (Figura 13 A), efeito significativo no estresse (SM ou nSM) [$F(1,55)= 13,90$; $p= 0,00$], no tratamento (vitamina D ou veículo) [$F(1,55)=9,4415$; $p=0,003297$], na interação condição (álcool ou salina) e estresse [$F(1,55)=7,57$; $p=0,00$], na interação condição e tratamento [$F(1,55)= 9,4394$; $p=0,003300$], na interação estresse e tratamento [$F(1,55)= 7,56$; $p=0,00$]. O *post hoc* de Duncan revelou que os animais expostos somente ao álcool sem tratamento da vitamina D foram aqueles que tiveram o maior tempo na latência para comer e apresentou uma diferença significativa $p<0,01$ e em relação ao grupo controle veículo. Os animais expostos ao álcool e estresse que receberam tratamento de vitamina D foram aqueles que tiveram um menor tempo na latência para comer e o *post hoc* apresentou diferença significativa $p<0,001$ em relação ao grupo correspondente (álcool+SM+veículo) e em relação ao grupo controle. No parâmetro Tempo comendo (Figura 13 B) a ANOVA revelou efeito significativo na variável estresse [$F(1,55)=5,12$; $p=0,03$], na interação condição e estresse [$F(1,55)=10,39$; $p=0,00$] e na interação estresse e tratamento [$F(1,55)=6,91$; $p=0,01$]. O teste *post hoc* demonstrou que o grupo exposto ao álcool e estresse tratados com vitamina D foi aquele que apresentou o maior tempo comendo o alimento palatável, com diferença significativa de $p<0,01$ em relação ao seu grupo correspondente e $p<0,001$ em relação ao grupo controle. No parâmetro Unidades consumidas (Figura 13 C) houve efeito

significativo na variável condição [$F(1,55)=7,21$; $p=0,01$], estresse [$F(1,55)=20,4787$; $p=0,00$] e na interação condição e estresse [$F(1,55)=8,12$; $p=0,01$]. O teste *post hoc* demonstrou que o grupo exposto ao álcool e estresse, tratados com vitamina D foi aquele que mais consumiu unidades do alimento palatável e apresentou diferença significativa $p<0,01$ em relação ao seu grupo correspondente e $p<0,001$ em relação ao grupo controle. O grupo álcool e estresse sem tratamento teve diferença significativa de $p<0,05$ em relação ao grupo controle.

Figura 13 - Efeito do tratamento com vitamina D em um modelo de exposição pré-natal ao álcool e estresse por SM na motivação, através do teste de ingestão de alimento palatável em animais não privados de alimento.



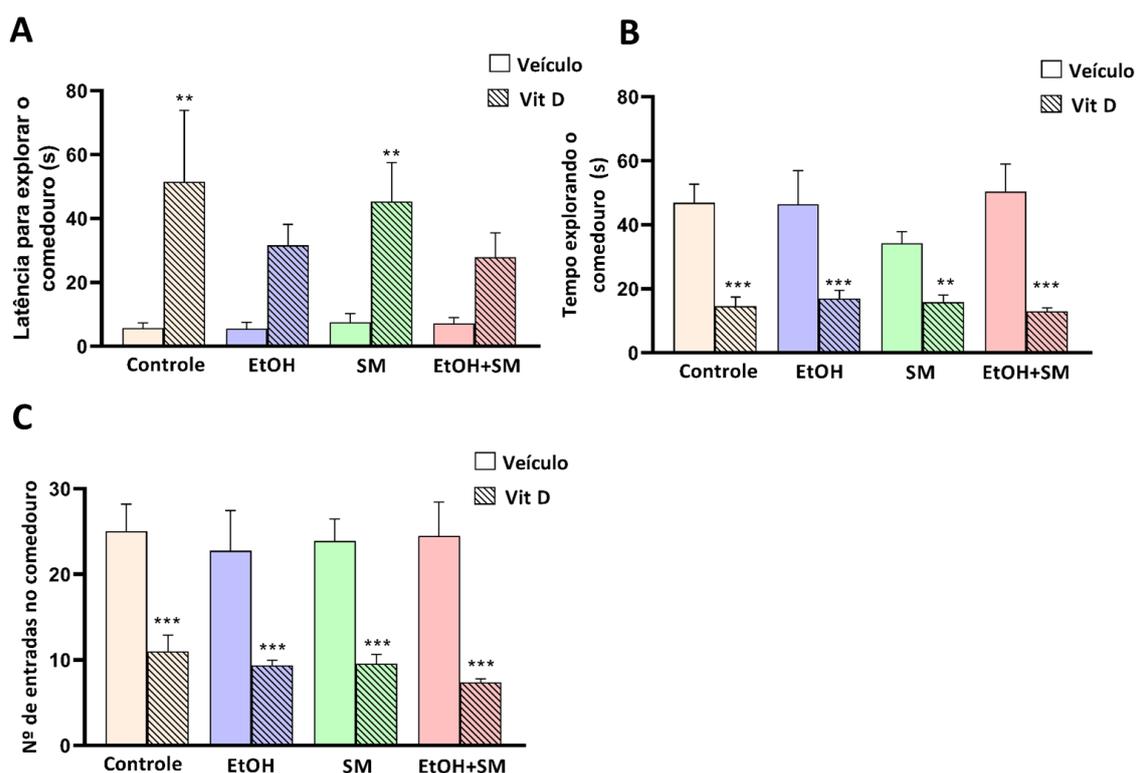
Os valores estão expressos em média \pm E.P.M. (8 animais/grupo). Latência para comer (A). Tempo comendo (B). Unidades consumidas (C). ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ em relação ao grupo correspondente sem vitamina D; # $p < 0,5$, ## $p < 0,01$ e ### $p < 0,001$ em relação ao grupo controle. SM: separação materna; EtOH+SM: Álcool+separação materna.

6.2 EFEITOS DA VITAMINA D SOBRE A FRUSTRAÇÃO EM ANIMAIS NÃO PRIVADOS DE ALIMENTO

Com a finalidade de avaliar os efeitos da vitamina D sobre a incapacidade de alcançar um reforçador (alimento palatável) foi realizado o teste de Frustração em animais expostos ao álcool e estresse. No parâmetro latência para explorar o comedouro (Figura 14 A), a ANOVA multifatorial revelou diferença significativa na variável tratamento [$F(1,55) = 21,24$; $p < 0,001$]. O *post hoc* de Duncan demonstrou que os animais que mais demoraram para explorar o comedouro foram aqueles tratados apenas com vitamina D, sem intervenções, apresentando diferença significativa $p < 0,01$ em relação ao seu grupo correspondente (salina+nSM+veículo). O grupo SM tratado com vitamina D apresentou diferença significativa $p < 0,01$ em relação ao seu grupo correspondente. No parâmetro tempo explorando o comedouro (Figura 14 B) a ANOVA apresentou diferença significativa na variável tratamento [$F(1,55) = 71,15$; $p < 0,001$]. O grupo álcool e estresse sem tratamento foi o que passou mais tempo explorando o comedouro e seu grupo correspondente foi o que passou menos tempo explorando. O teste *post hoc* demonstrou que todos os grupos tratados com vitamina D apresentaram diferença significativa $p < 0,001$ em relação ao seu grupo correspondente, apenas o grupo SM teve $p < 0,01$. No parâmetro número de entradas no comedouro (Figura 14 C) a ANOVA apresentou diferença significativa na variável tratamento [$F(1,55) = 75,77$; $p = 0,001$]. O grupo controle veículo foi o que mais teve

entradas no comedouro e o que menos entrou foi o grupo álcool+SM+vitamina D. O teste *post hoc* demonstrou que todos os grupos tratados com vitamina D apresentaram diferença significativa $p < 0,001$ em relação ao seu grupo correspondente.

Figura 14 - Efeito do tratamento com vitamina D em um modelo de exposição pré-natal ao álcool e estresse, na frustração, através do teste de frustração.



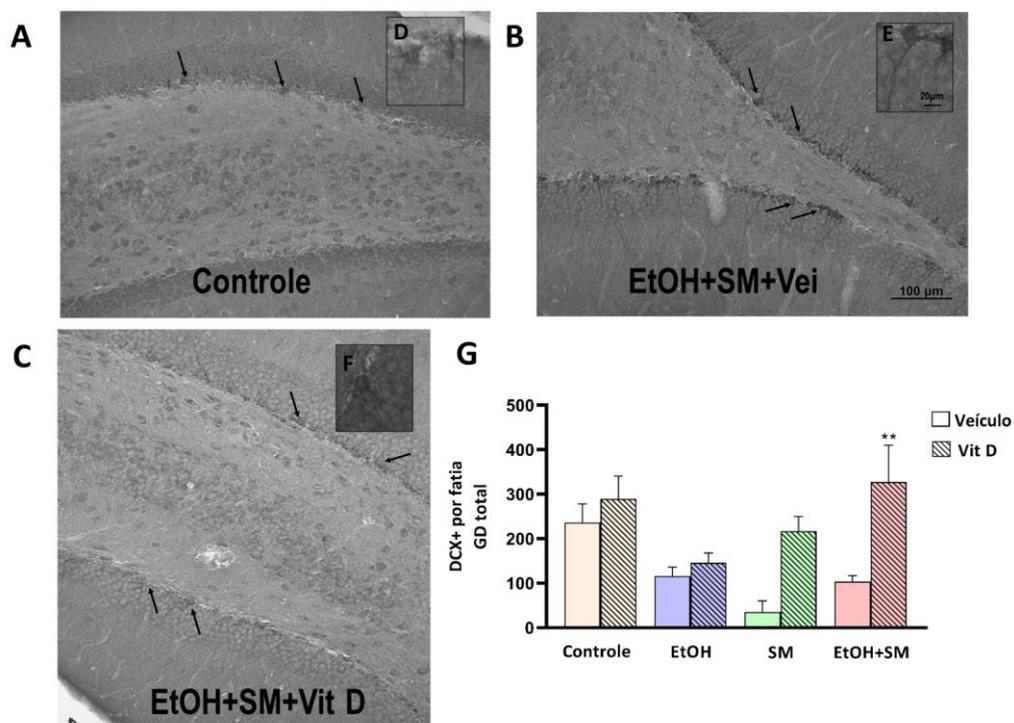
Os valores estão expressos em média \pm E.P.M. (8 animais/grupo). Latência para explorar o comedouro (A). Tempo explorando o comedouro (B). Nº de entradas no comedouro (C). ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ em relação ao grupo correspondente. SM: separação materna; EtOH+SM: Álcool+ separação materna.

6.3 EFEITO DA VITAMINA D SOBRE A DIFERENCIAÇÃO NEURONAL HIPOCAMPAL

Com a finalidade de avaliar o efeito da Vitamina D sobre a diferenciação neuronal em ratos expostos precocemente ao álcool e estresse foi realizada imunohistoquímica para o marcador endógeno doublecortina (DCX) e a quantificação das células DCX positivas ao longo da ZSG do GD da formação hipocampal (Figura 15). A ANOVA multifatorial revelou diferença significativa na variável tratamento (veículo ou vitamina D) [$F(1,35)=8,27$; $p<0,01$] e na interação entre a condição (salina ou álcool) e estresse (SM ou nSM) [$F(1,35)=6,51$; $p<0,05$]. O teste *post hoc* de Duncan demonstrou diferença significativa $p<0,01$ do grupo álcool e estresse com tratamento em relação ao seu grupo correspondente.

Figura 15: Avaliação dos efeitos da vitamina D sobre a diferenciação neuronal na ZSG do GD da formação hipocampal de ratos adolescentes expostos

ao álcool e SM utilizando o marcador endógeno DCX

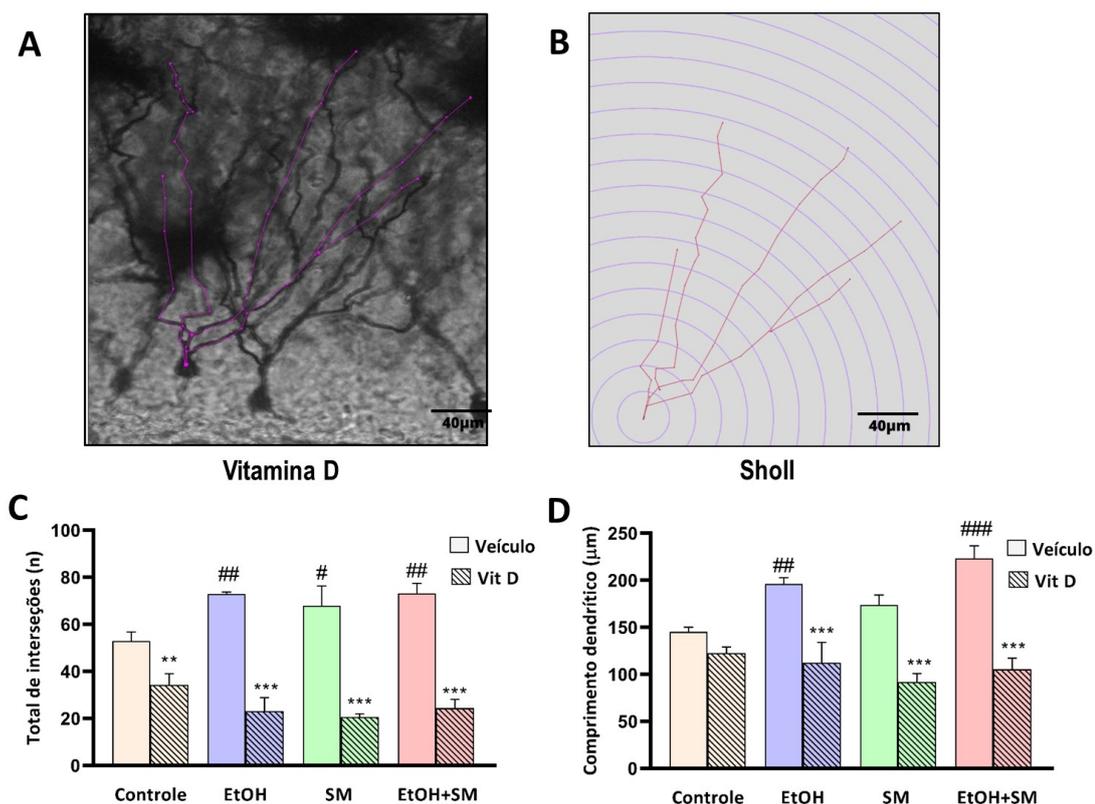


Os valores estão expressos em média \pm E.P.M. (6 fatias/grupo). (A) Fotomicrografias representativas de células DCX positivas na ZSG do GD da formação hipocampal dos ratos que não sofreram nenhuma intervenção (A). Fotomicrografias de ratos expostos ao álcool e estresse sem tratamento e com tratamento de vitamina D, respectivamente (B e C). (Barra de escala = 100 μ m). Fotomicrografias representativas de neurônios marcados para DCX na ZSG do GD de cada grupo (D, E e F). (Barra de escala = 20 μ m). Número de células positivas para DCX por número de fatias, no GD (G) **p<0,01em comparação ao grupo correspondente. SM: separação materna; EtOH+SM: Álcool+separação materna

6.4 EFEITO DA VITAMINA D NA ARBORIZAÇÃO DENDRÍTICA DE CÉLULAS GRANULARES DO GIRO DENTEADO

Com a finalidade de avaliar os efeitos da vitamina D na complexidade dendrítica, foi realizado a análise de Sholl nas células granulares do giro denteado impregnadas por uma solução de Golgi. No número total de interseções (Figura 16 C) a ANOVA multifatorial revelou diferença significativa nas variáveis tratamento [$F(1,16)=152,65;p<0,001$], na interação entre condição (salina ou álcool) e tratamento [$F(1,16)=5,9936;p<0,05$] e na interação entre condição, estresse (SM ou nSM) e tratamento [$F(1,16)=4.9310;p<0,05$]. No comprimento dendrítico a ANOVA revelou diferença significativa nas variáveis condição [$F(1,16)=10,05;p<0,001$], na interação condição e tratamento [$F(1,16)=8,707;p=0,01$] e na interação estresse e tratamento [$F(1,16)= 8,12;p<0,01$]

Figura 16: Efeito da vitamina D na complexidade dendrítica de neurônios granulares do giro denteado do hipocampo



Os valores estão expressos em média \pm E.P.M. (3 animais/grupo; 5 neurônios/ animal). Imagem representativa da impregnação por Golgi na célula granular do GD no grupo vitamina D (A). Imagem representativa na análise de Sholl (B). Número total de interseções (C). Comprimento do dendrito (D). ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ comparado com o grupo correspondente, # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$ e ### $p < 0,001$ comparado com o grupo controle. SM: separação materna; EtOH+SM: Álcool+separação materna

7 DISCUSSÃO

As primeiras experiências de vida exercem influências importantes no desenvolvimento neural, comportamental e psicológico das crianças e podem ter efeitos duradouros em vários domínios. A experiência molda a plasticidade neural e principalmente no que diz respeito a infância e primeira infância, visto que são períodos de intenso remodelamento das sinapses (SMITH; POLLAK, 2020). Nesse estudo realizamos dois protocolos de estresse no início da vida: a) estresse físico, com a exposição perinatal ao álcool; b) estresse psicológico, com a separação materna e avaliamos se a vitamina D modula o comportamento motivado e a neuroplasticidade hipocampal.

O consumo de alimento palatável é um indicador hedônico atribuído aos animais e a preferência por sacarose é utilizada como medida comportamental de anedonia (SCHEGGI; DE MONTIS; GAMBARANA, 2018; WILMOUTH; SPEAR, 2009). No teste de ingestão de alimento palatável em animais não-privados de alimentos a EPA causou um aumento da latência para comer, o que pode ser interpretado como anedonia, e o tratamento com vitamina D reverteu parcialmente esse aumento. Dessa maneira, podemos inferir que a vitamina D foi capaz de provocar uma reversão parcial nas características de anedonia nos animais submetidos à condição e estresse. Ainda, a vitamina D diminuiu a latência para comer nos animais submetidos ao álcool e a SM, aumentando a motivação pelo alimento palatável. Um estudo publicado por Turner e colaboradores em 2013 demonstrou que ratos Sprague Dawley adultos deficientes em vitamina D exibiram impulsividade e diminuição da latência de recompensa na tarefa

de desempenho contínuo de 5 opções (TURNER et al., 2013). A latência de recompensa reduzida é sugestiva de aumento da motivação. De fato, isso também foi observado na tarefa de jogo com roedores, em que os ratos deficientes em vitamina D ganharam mais recompensas alimentares por sessão e também precisaram de menos treinos para atingir o critério, sem mostrar quaisquer outras deficiências comportamentais (PEAK; TURNER; BURNE, 2015). Assim, a vitamina D parece modular a impulsividade e motivação em roedores.

No parâmetro tempo comendo, o tratamento com vitamina D foi capaz de aumentar o tempo comendo no grupo exposto ao álcool e ao estresse no início da vida. O grupo EtOH+SM+vit D foi o que passou mais tempo comendo com diferença significativa em relação ao grupo controle e o grupo correspondente, o que sugere um aumento no interesse pelo estímulo reforçador, o que sugere um aumento no interesse pelo estímulo reforçador e isso corrobora com o trabalho de Camargo, *et al*, 2020 onde a administração de colecalciferol foi capaz de reverter o comportamento tipo depressivo e anedônico em animais submetidos a administração crônica de corticosterona (CAMARGO et al., 2020) .

O tratamento com vitamina D também causou um aumento nas unidades de alimento palatável consumidas no grupo que foi exposto ao álcool e a SM, isso vai de acordo com o trabalho de Sedaghat e colaboradores, onde a vitamina D diminuiu o comportamento anedônico nos testes de preferência por sacarose, campo aberto e teste de exploração por um novo objeto (SEDAGHAT et al., 2019) . Dessa forma, os animais que passaram mais tempo comendo também foram aqueles que consumiram

mais unidades, esse efeito pode ser considerado positivo, visto que pode ser interpretado pelo aumento do comportamento motivado, revertendo características anedônicas. No entanto, em razão do aumento expressivo no consumo e no tempo do alimento açucarado, também poder ser interpretado como um comportamento persistente, compulsivo e de risco, visto que esses animais preferem correr o risco de ficar mais tempo no centro do aparato do que não comer o alimento palatável. Conforme revisado por Roy Wise em 1987, o comportamento controlado por drogas parece imitar o comportamento controlado por substâncias recompensadoras naturais, sugerindo mecanismos comuns, mas isso não prova que os comportamentos sejam idênticos (WISE, 1987).

O estudo da frustração teve início nos anos 50 com Amssel e Roussel (1952) analisando o então chamado efeito da omissão de reforço (EOR) e observaram que após cessarem o estímulo reforçador os animais tinham um aumento na resposta instrumental que poderia estar relacionada a uma reação emocional como a frustração (AMSEL; ROUSSEL, 1952). Os resultados do teste de frustração demonstraram que o tratamento com a vitamina D foi capaz de diminuir os efeitos da frustração. Os animais dos grupos que receberam tratamento com vitamina D demoraram mais para explorar o comedouro, passaram menos tempo comendo e tiveram menos entradas na região do comedouro, isso sugere que esses animais tiveram uma diminuição da resposta instrumental depois do EOR, apresentaram menos o comportamento de cavar em busca do alimento palatável, demonstrando uma maior adaptabilidade a falta do alimento hedônico.

Os resultados da imunohistoquímica para diferenciação celular mostraram que a vitamina D aumentou o número de neuroblastos no giro denteado hipocampal nos animais expostos ao álcool e ao estresse. Efeitos semelhantes foram observados no trabalho de Morello e colaboradores (2018) em que a vitamina D aumentou a proliferação e diferenciação celular em um modelo da doença de Alzheimer, o que pode justificar os efeitos no aumento da diferenciação neuronal com o tratamento da vitamina D. Shirazi e colaboradores (2015) também mostraram que a vitamina D aumenta a diferenciação neuronal *in vitro* (SHIRAZI et al., 2015). Esse resultado está de acordo com o trabalho de McGrath e colaboradores (2004) (MCGRATH et al., 2004) que encontraram aumento da proliferação celular em filhotes depletados de vitamina D. O que pode ser explicado pelo fato de que a vitamina D tem propriedades pró-diferenciação celular portanto na ausência de vitamina D as células continuam proliferando mas não se diferenciam em neurônios (DELUCA; KRISINGER; DARWISH, 1990).

Neurônios mais diferenciados estão envolvidos em processos de sinaptogênese, formando redes neurais mais eficientes. Estudos prévios mostraram que a suplementação de vitamina D demonstrou regular genes envolvidos na plasticidade sináptica, como a sinaptojanina 1 e sinaptoquina 2 e a proteína quinase dependente de cálcio/calmodulina II α (CaMKII α) (LATIMER et al., 2014). Além disso, também está envolvida com o aumento de neurotransmissores importantes para a sinaptogênese, como dopamina, serotonina e glutamato (MAYNE; BURNE, 2019).

No nosso trabalho, os animais que foram expostos ao álcool e a SM *per se* e combinados foram os que apresentaram diminuição da neurogênese

adulta. A literatura apresenta alguns estudos controversos sobre o aumento ou diminuição da neurogênese em animais expostos ao álcool durante o desenvolvimento. Alguns fatores podem explicar essas diferenças, como o modelo animal, a dose de álcool e do período de exposição. O estudo de Gil-Mohapel (2011) mostrou que os animais expostos ao álcool no terceiro trimestre equivalente, apresentavam uma desregulação no processo neurogênico, com maior proliferação de neurônios imaturos (GIL-MOHAPÉL et al., 2011). Além, disso, a neurogênese foi afetada somente a longo prazo, em animais idosos, sendo preservada nos animais jovens (GIL-MOHAPÉL et al., 2014).

A exposição ao álcool, ao estresse e a combinação dos dois no terceiro trimestre equivalente aumentou o processo de ramificação dendrítica dos neurônios do hipocampo, resultando em uma maturação em um período inapropriado, o que pode levar a efeitos negativos a longo prazo. O tratamento com a vitamina D reverteu esse processo. Na perspectiva evolutiva é útil amadurecer mais cedo se você vive em um ambiente estressante. Resultado similar foi visualizado no trabalho de Bath e colaboradores (2016) em que o estresse no início da vida modificou o processo de neurodesenvolvimento e acelerou o processo de maturação neuronal. No trabalho de Sambo e colaboradores (2022) foi visto que a exposição precoce ao álcool regula negativamente a sinalização da Wnt, que em processos saudáveis promove a proliferação e inibe a diferenciação nos estágios iniciais de desenvolvimento. Diante disso, a regulação negativa de Wnt pode ter resultado na maturação neuronal prematura dos neurônios (SAMBO et al., 2022). No nosso trabalho, a vitamina D foi capaz de reverter

a maturação precoce dos neurônios fazendo com que todas as interferências (álcool, estresse e a combinação) tenham o mesmo padrão do controle.

8 CONCLUSÃO

Diante dos resultados apresentados, se pode concluir que a vitamina D apresentou uma reversão parcial do comportamento anedônico apresentado pelos animais expostos ao álcool no terceiro trimestre equivalente e diminuiu a frustração após EOR. Além disso, a vitamina D aumentou a diferenciação neuronal no período equivalente a adolescência nos animais expostos ao álcool e estresse no início da vida ao mesmo tempo que reverteu a maturação precoce dos neurônios granulares hipocampais.

REFERÊNCIAS

ALBERRY, B.; SINGH, S. M. Developmental and behavioral consequences of early life maternal separation stress in a mouse model of fetal alcohol spectrum disorder. **Behavioural Brain Research**, v. 308, p. 94–103, 2016.

Alcohol. World Health Organization (WHO). Setembro 2018 Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/alcohol>> Acesso em : 23/04/2020

BARBOSA T.S., J. Marino-Neto, C.L. Oliveira, **Spontaneous Behavioral Responses to Reinforcement Suppression: an Ethological Approach to Frustration in Rats**, Federal University of Santa Catarina, 2017.

BIANCO, C.D. **Efeitos do tratamento com vitamina D em déficits induzidos por exposição ao álcool e estresse no início da vida**. 2019.67f. Dissertação (Mestrado em Neurociências) - Programa de Pós-Graduação em Neurociências, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2019.

BIGGIO, F. et al. Low doses of prenatal ethanol exposure and maternal separation alter HPA axis function and ethanol consumption in adult male rats. **Neuropharmacology**, v. 131, p. 271–281, 2018.

ABRAHAO, K. P.; SALINAS, A. G.; LOVINGER, D. M. Alcohol and the Brain: Neuronal Molecular Targets, Synapses, and Circuits. **Neuron**, v. 96, n. 6, p. 1223–1238, 2017.

ALMEIDA, L. et al. Murine Models for the Study of Fetal Alcohol Spectrum Disorders: An Overview. **Frontiers in Pediatrics**, v. 8, n. July, 2020.

ALMERAS, L. et al. Developmental vitamin D deficiency alters brain protein expression in the adult rat: Implications for neuropsychiatric disorders. **Proteomics**, v. 7, n. 5, p.

769–780, 2007.

AMSEL, A.; ROUSSEL, J. Motivational properties of frustration: I. Effect on a running response of the addition of frustration to the motivational complex. **Journal of Experimental Psychology**, v. 43, n. 5, p. 363–368, 1952.

ATKIN, S. M. Z. I. M.; ICH, R. I. A. D. Ethanol metabolism in the brain. **Addiction biology**, n. April, p. 387–399, 1997.

AYANLAJA, A. A. et al. Distinct features of doublecortin as a marker of neuronal migration and its implications in cancer cell mobility. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 10, n. June, p. 1–13, 2017.

BATH, K. G.; MANZANO-NIEVES, G.; GOODWILL, H. Early life stress accelerates behavioral and neural maturation of the hippocampus in male mice. **Hormones and Behavior**, v. 82, p. 64–71, 2016.

BERGMAN, N. J. Birth practices: Maternal-neonate separation as a source of toxic stress. **Birth Defects Research**, v. 111, n. 15, p. 1087–1109, 2019.

BERRIDGE, M. J. Vitamin D and depression: Cellular and regulatory mechanisms. **Pharmacological Reviews**, v. 69, n. 2, p. 80–92, 2017.

BIANCO, C. D. et al. Effects of postnatal ethanol exposure and maternal separation on mood, cognition and hippocampal arborization in adolescent rats. **Behavioural Brain Research**, v. 411, n. April, p. 113372, 2021.

BIGGIO, F. et al. Low doses of prenatal ethanol exposure and maternal separation alter HPA axis function and ethanol consumption in adult male rats. **Neuropharmacology**, v. 131, p. 271–281, 2018.

BIKLE, D.; CHRISTAKOS, S. New aspects of vitamin D metabolism and action — addressing the skin as source and target. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 16, n. 4, p. 234–252, 2020.

BIVONA, G. et al. Vitamin D and the nervous system. **Neurological Research**, v. 41, n. 9, p. 827–835, 2019.

BOSCHEN, K. E.; KLINTSOVA, A. Y. **Neurotrophins in the Brain: Interaction With Alcohol Exposure During Development**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2017. v. 104

BRADY, M. L. et al. Moderate prenatal alcohol exposure reduces plasticity and alters NMDA receptor subunit composition in the dentate gyrus. **Journal of Neuroscience**, v. 33, n. 3, p. 1062–1067, 2013.

BROCARD, P. S.; GIL-MOHAPEL, J.; CHRISTIE, B. R. The role of oxidative stress in fetal alcohol spectrum disorders. **Brain Research Reviews**, v. 67, n. 1–2, p. 209–225, 2011.

BROWN, J. P. et al. Transient Expression of Doublecortin during Adult Neurogenesis. **Journal of Comparative Neurology**, v. 467, n. 1, p. 1–10, 2003.

BURD, L.; BLAIR, J.; DROPPS, K. Prenatal alcohol exposure, blood alcohol concentrations and alcohol elimination rates for the mother, fetus and newborn. **Journal of Perinatology**, v. 32, n. 9, p. 652–659, 2012.

BURKE, S. N.; BARNES, C. A. Neural plasticity in the ageing brain. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 7, n. 1, p. 30–40, 2006.

CAMARGO, A. et al. Cholecalciferol abolishes depressive-like behavior and hippocampal glucocorticoid receptor impairment induced by chronic corticosterone administration in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 196, n. April,

p. 172971, 2020.

CEDERBAUM, A. I. Alcohol Metabolism. **Clinics in Liver Disease**, v. 16, n. 4, p. 667–685, 2012.

CEREDA, G. et al. The role of vitamin D in bipolar disorder: Epidemiology and influence on disease activity. **Journal of Affective Disorders**, v. 278, p. 209–217, 2021.

CHEN, Y.; BARAM, T. Z. Toward understanding how early-life stress reprograms cognitive and emotional brain networks. **Neuropsychopharmacology**, v. 41, n. 1, p. 197–206, 2016.

CHERNOFF, G. F. The fetal alcohol syndrome in mice: an animal model. *Teratology* 15:223-30. 1977. **Birth defects research. Part A, Clinical and molecular teratology**, v. 88, n. 10, p. 811–817, 2010.

CHINI, M.; HANGANU-OPATZ, I. L. Prefrontal Cortex Development in Health and Disease: Lessons from Rodents and Humans. **Trends in Neurosciences**, v. 44, n. 3, p. 227–240, 2021.

CROCKER, N.; NGUYEN, T. T.; MATTSON, S. N. Fetal Alcohol Spectrum Disorders: Neuropsychological and Behavioral Features. **Neuropsychology review**, v. 21, n. 2, p. 81–101, 2011.

CUI, X. et al. Vitamin D and schizophrenia: 20 years on. **Molecular Psychiatry**, v. 26, n. 7, p. 2708–2720, 2021.

DE ALMEIDA, L. F. Vitamin D Actions on Cell Differentiation, Proliferation and Inflammation. **International Journal of Complementary & Alternative Medicine**, v. 6, n. 5, p. 5–6, 2017.

DE GIORGIO, A.; GRANATO, A. Reduced density of dendritic spines in pyramidal neurons of rats exposed to alcohol during early postnatal life. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 41, p. 74–79, 2015.

DENOTH-LIPPUNER, A.; JESSBERGER, S. Formation and integration of new neurons in the adult hippocampus. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 22, n. 4, p. 223–236, 2021.

DOMÍNGUEZ-RIVAS, E. et al. Adult hippocampal neurogenesis in the context of lipopolysaccharide-induced neuroinflammation: A molecular, cellular and behavioral review. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 97, n. June, p. 286–302, 2021.

DOODY, E. E. et al. **Ethanol metabolism by alcohol dehydrogenase or cytochrome P450 2E1 differentially impairs hepatic protein trafficking and growth hormone signaling**. [s.l.: s.n.]. v. 313

EGERVARI, G. et al. Alcohol and the brain: from genes to circuits. **Trends in Neurosciences**, v. 44, n. 12, p. 1004–1015, 2021.

EHRHART, F. et al. Review and gap analysis: molecular pathways leading to fetal alcohol spectrum disorders. **Molecular Psychiatry**, v. 24, n. 1, p. 10–17, 2019.

ELLERO, N. et al. Study on NGF and VEGF during the Equine Perinatal Period—Part 1: Healthy Foals Born from Normal Pregnancy and Parturition. **Veterinary Sciences**, v. 9, n. 9, 2022.

ETHEN, M. K. et al. Alcohol consumption by women before and during pregnancy. **Maternal and Child Health Journal**, v. 13, n. 2, p. 274–285, 2009.

EYLES, D. et al. Vitamin D3 and brain development. **Neuroscience**, v. 118, n. 3, p. 641–653, 2003.

EYLES, D. W. et al. Distribution of the Vitamin D receptor and 1 α -hydroxylase in human brain. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 29, n. 1, p. 21–30, 2005.

EYLES, D. W.; BURNE, T. H. J.; MCGRATH, J. J. Vitamin D, effects on brain development, adult brain function and the links between low levels of vitamin D and neuropsychiatric disease. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 34, n. 1, p. 47–64, 2013.

FARES, J. et al. Neurogenesis in the adult hippocampus: history, regulation, and prospective roles. **International Journal of Neuroscience**, v. 129, n. 6, p. 598–611, 2019.

FERNELL, E. et al. Autism spectrum disorder and low vitamin D at birth: A sibling control study. **Molecular Autism**, v. 6, n. 1, p. 1–9, 2015.

FERREIRA, T. A. et al. Neuronal morphometry directly from bitmap images. **Nature Methods**, v. 11, n. 10, p. 982–984, 29 out. 2014.

FILGUEIRAS, C. C.; KRAHE, T. E.; MEDINA, A. E. gestation. v. 473, n. 3, p. 202–207, 2011.

FONTAINE, C. J. et al. Effects of pre-natal alcohol exposure on hippocampal synaptic plasticity: Sex, age and methodological considerations. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 64, p. 12–34, 2016.

GAN, J. et al. The Effect of Vitamin D Supplementation on Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. **Journal of Child and Adolescent Psychopharmacology**, v. 29, n. 9, p. 670–687, 2019.

GENSEL, J. C. et al. Semi-automated Sholl analysis for quantifying changes in growth

and differentiation of neurons and glia. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 190, n. 1, p. 71–79, 2010.

GIL-MOHAPPEL, J. et al. Hippocampal cell loss and neurogenesis after fetal alcohol exposure: Insights from different rodent models. **Brain Research Reviews**, v. 64, n. 2, p. 283–303, 2010.

GIL-MOHAPPEL, J. et al. Altered adult hippocampal neuronal maturation in a rat model of fetal alcohol syndrome. **Brain Research**, v. 1384, p. 29–41, 2011.

GIL-MOHAPPEL, J. et al. Prenatal ethanol exposure differentially affects hippocampal neurogenesis in the adolescent and aged brain. **Neuroscience**, v. 273, p. 174–188, 2014.

GIL-MOHAPPEL, J. et al. **Ethanol exposure during development, and brain oxidative stress**. [s.l.] Elsevier Inc., 2019.

GOEKE, C. M. et al. Neonatal Ethanol and Choline Treatments Alter the Morphology of Developing Rat Hippocampal Pyramidal Neurons in Opposite Directions. **Neuroscience**, v. 374, n. January, p. 13–24, 2018.

GONÇALVES, J. T.; SCHAFER, S. T.; GAGE, F. H. Adult Neurogenesis in the Hippocampus: From Stem Cells to Behavior. **Cell**, v. 167, n. 4, p. 897–914, 2016.

GUERRA, A. et al. **ÁLCOOL E A SAÚDE DOS BRASILEIROS CISA-Centro de Informações Sobre Saúde e Álcool PRESIDENTE EXECUTIVO REVISÃO DE TEXTO Potira Cunha FICHA CATALOGRÁFICA CENTRO DE INFORMAÇÕES SOBRE SAÚDE E ÁLCOOL-CISA**. [s.l.: s.n.].

GUPTA, K. K.; GUPTA, V. K.; SHIRASAKA, T. An Update on Fetal Alcohol Syndrome—Pathogenesis, Risks, and Treatment. **Alcoholism: Clinical and**

Experimental Research, v. 40, n. 8, p. 1594–1602, 2016.

HAINMUELLER, T.; BARTOS, M. Dentate gyrus circuits for encoding, retrieval and discrimination of episodic memories. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 21, n. 3, p. 153–168, 2020.

HANEL, A.; CARLBERG, C. Vitamin D and evolution: Pharmacologic implications. **Biochemical Pharmacology**, v. 173, n. July, 2020.

HELPER, J. L. et al. The effects of exercise on adolescent hippocampal neurogenesis in a rat model of binge alcohol exposure during the brain growth spurt. **Brain Research**, v. 1294, p. 1–11, 2009.

HELGESSION, G. et al. Ethical aspects of diagnosis and interventions for children with fetal alcohol Spectrum disorder (FASD) and their families. **BMC medical ethics**, v. 19, n. 1, p. 1, 2018.

HELLER, M.; BURD, L. Review of ethanol dispersion, distribution, and elimination from the fetal compartment. **Birth Defects Research Part A - Clinical and Molecular Teratology**, v. 100, n. 4, p. 277–283, 2014.

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

HERZBERG, M. P.; GUNNAR, M. R. Early life stress and brain function: Activity and connectivity associated with processing emotion and reward. **NeuroImage**, v. 209, n. June 2019, p. 116493, 2020.

HOLLIS, B. W. Vitamin D requirement during pregnancy and lactation. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 22, n. SUPPL. 2, 2007.

HORST, R. L.; REINHARDT, T. A.; REDDY, G. S. Vitamin D Metabolism. **Vitamin D**, v. 1, p. 15–36, 2005.

HUOT, R. L. et al. Foster litters prevent hypothalamic-pituitary-adrenal axis sensitization mediated by neonatal maternal separation. **Psychoneuroendocrinology**, v. 29, n. 2, p. 279–289, 2004.

HYUN, J. et al. Pathophysiological aspects of alcohol metabolism in the liver. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 11, p. 11–14, 2021.

IKONOMIDOU, C. et al. Ethanol-induced apoptotic neurodegeneration and fetal alcohol syndrome. **Science**, v. 287, n. 5455, p. 1056–1060, 2000.

ITO, T. A.; MILLER, N.; POLLOCK, V. E. Alcohol and aggression: A meta-analysis on the moderating effects of inhibitory cues, triggering events, and self-focused attention. **Addictive behaviors: Readings on etiology, prevention, and treatment.**, v. 120, n. 1, p. 430–481, 2004.

JONES, K. L. et al. Pattern of Malformation in Offspring of Chronic Alcoholic Mothers. **The Lancet**, v. 301, n. 7815, p. 1267–1271, 1973.

JONES, K. L.; SMITH, D. W. Recognition of the Fetal Alcohol Syndrome in Early Infancy. **The Lancet**, v. 302, n. 7836, p. 999–1001, 1973.

JUDICE-DAHER, D. M. et al. Influence of the reinforcement magnitude on omission effects. **Behavioural Processes**, v. 88, n. 1, p. 60–62, 2011.

KELLER, M. A historical overview of alcohol and alcoholism. **Cancer Research**, v. 39, p. 2822–2829, 1979.

KELLER, M. C.; NESSE, R. M. Is low mood an adaptation? Evidence for subtypes

with symptoms that match precipitants. v. 86, p. 27–35, 2005.

KEMPERMANN, G.; SONG, H.; GAGE, F. H. Neurogenesis in the Adult Hippocampus. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 7, n. 9, p. a018812, 2015.

KHADERI, S. A. Introduction: Alcohol and Alcoholism. **Clinics in Liver Disease**, v. 23, n. 1, p. 1–10, 2019.

KLINTSOVA, A. Y. et al. Persistent impairment of hippocampal neurogenesis in young adult rats following early postnatal alcohol exposure. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 31, n. 12, p. 2073–2082, 2007.

KOLESKE, A. J. Molecular mechanisms of dendrite stability. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 14, n. 8, p. 536–550, 2013.

KUHN, H. G.; TODA, T.; GAGE, F. H. Adult hippocampal neurogenesis: A coming-of-age story. **Journal of Neuroscience**, v. 38, n. 49, p. 10401–10410, 2018.

KULKARNI, V. A.; FIRESTEIN, B. L. The dendritic tree and brain disorders. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 50, n. 1, p. 10–20, 2012.

LANGE, S. et al. Prevalence of fetal alcohol spectrum disorders in child care settings: A meta-analysis. **Pediatrics**, v. 132, n. 4, 2013.

LANGE, S. et al. Neurodevelopmental profile of Fetal Alcohol Spectrum Disorder: A systematic review. **BMC Psychology**, v. 5, n. 1, p. 1–12, 2017.

LATIMER, C. S. et al. Vitamin D prevents cognitive decline and enhances hippocampal synaptic function in aging rats. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 41, p. E4359–E4366, 2014.

LAWRENCE, D. W.; SHARMA, B. A review of the neuroprotective role of vitamin D in

traumatic brain injury with implications for supplementation post-concussion. **Brain Injury**, v. 30, n. 8, p. 960–968, 2016.

LOUCKS, E.; AHLGREN, S. Assessing teratogenic changes in a zebrafish model of fetal alcohol exposure. **Journal of visualized experiments : JoVE**, n. 61, p. 1–7, 2012.

MANARI, A. P.; PREEDY, V. R.; PETERS, T. J. Nutritional intake of hazardous drinkers and dependent alcoholics in the UK. **Addiction Biology**, v. 8, n. 2, p. 201–210, 2003.

MANTHEY, J. et al. Global alcohol exposure between 1990 and 2017 and forecasts until 2030: a modelling study. **The Lancet**, v. 393, n. 10190, p. 2493–2502, 2019.

MAYA-ENERO, S. et al. Neurocognitive and behavioral profile of fetal alcohol spectrum disorder. **Anales de Pediatría (English Edition)**, v. 95, n. 3, p. 208.e1–208.e9, 2021.

MAYNE, P. E.; BURNE, T. H. J. Vitamin D in Synaptic Plasticity, Cognitive Function, and Neuropsychiatric Illness. **Trends in Neurosciences**, v. 42, n. 4, p. 293–306, 2019.

MCGRATH, J. J. et al. Vitamin D3 - Implications for brain development. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 89–90, p. 557–560, 2004.

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. **Journal of Neurophysiology**, v. 93, n. 3, p. 1317–1325, 2005.

MICHAELSEN, M. M.; ESCH, T. Motivation and reward mechanisms in health behavior change processes. **Brain Research**, v. 1757, n. January, p. 147309, 2021.

MILNE, M.; BARAN, D. T. Inhibitory effect of maternal alcohol ingestion on rat pup hepatic 25-hydroxyvitamin D production. **Pediatric Research**, v. 19, n. 1, p. 102–104, 1985.

MORALES, I.; BERRIDGE, K. C. 'Liking' and 'wanting' in eating and food reward: Brain mechanisms and clinical implications. **Physiology and Behavior**, v. 227, n. January, p. 113152, 2020.

MORELLO, M. et al. Vitamin D Improves Neurogenesis and Cognition in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. **Molecular Neurobiology**, v. 55, n. 8, p. 6463–6479, 2018.

NIKLISON-CHIROU, M. V. et al. Regulation of adult neurogenesis in mammalian brain. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 14, p. 1–21, 2020.

NISHI, M. Effects of Early-Life Stress on the Brain and Behaviors: Implications of Early Maternal Separation in Rodents. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 19, 2020.

O'CONNOR, M. J.; KOGAN, N.; FINDLAY, R. Prenatal alcohol exposure and attachment behavior in children. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 26, n. 10, p. 1592–1602, 2002.

PATTEN, A. R. et al. Effects of ethanol exposure during distinct periods of brain development on hippocampal synaptic plasticity. **Brain Sciences**, v. 3, n. 3, p. 1076–1094, 2013.

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, n. SEP, p. 1–19, 2014.

PEAK, J. N.; TURNER, K. M.; BURNE, T. H. J. The effect of developmental vitamin D deficiency in male and female Sprague-Dawley rats on decision-making using a rodent gambling task. **Physiology and Behavior**, v. 138, p. 319–324, 2015.

PENZES, P. et al. Dendritic spine pathology in neuropsychiatric disorders. **Nature Neuroscience**, v. 14, n. 3, p. 285–293, 2011.

POLLAK, S. D. Early adversity and mechanisms of plasticity: Integrating affective neuroscience with developmental approaches to psychopathology. **Development and Psychopathology**, v. 17, n. 3, p. 735–752, 2005.

POPOVA, S. et al. Cost of Fetal Alcohol Spectrum Disorder Diagnosis in Canada. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, 2013.

POPOVA, S. et al. Estimation of national, regional, and global prevalence of alcohol use during pregnancy and fetal alcohol syndrome: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet Global Health**, v. 5, n. 3, p. e290–e299, 2017.

PUGLIA, M. P.; VALENZUELA, C. F. Repeated third trimester-equivalent ethanol exposure inhibits long-term potentiation in the hippocampal CA1 region of neonatal rats. **Alcohol**, v. 44, n. 3, p. 283–290, 2010.

RASMUSSEN, C.; WYPER, K. Decision making, executive functioning, and risky behaviors in adolescents with prenatal alcohol exposure. **International Journal on Disability and Human Development**, v. 6, n. 4, p. 405–416, 2007.

RILEY, E. P.; INFANTE, M. A.; WARREN, K. R. Fetal alcohol spectrum disorders: An overview. **Neuropsychology Review**, v. 21, n. 2, p. 73–80, 2011.

ROBERTO, M.; KIRSON, D.; KHOM, S. The role of the central amygdala in alcohol dependence. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 11, n. 2, p. 1–23,

2021.

SAMBO, D. et al. Cell type-specific changes in Wnt signaling and neuronal differentiation in the developing mouse cortex after prenatal alcohol exposure during neurogenesis. n. December, p. 1–16, 2022.

SANDERS, J. L.; BUCK, G. A long journey: Biological and non-biological parents' experiences raising children with FASD. **Journal of Population Therapeutics and Clinical Pharmacology**, v. 17, n. 2, 2010.

SCHEGGI, S.; DE MONTIS, M. G.; GAMBARANA, C. Making Sense of Rodent Models of Anhedonia. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 21, n. 11, p. 1049–1065, 1 nov. 2018.

SEDAGHAT, K. et al. **Mesolimbic dopamine system and its modulation by vitamin D in a chronic mild stress model of depression in the rat.** [s.l.] Elsevier B.V., 2019. v. 356

SENGUPTA, P. The laboratory rat: Relating its age with human's. **International Journal of Preventive Medicine**, v. 4, n. 6, p. 624–630, 2013.

SHIRAZI, H. A. et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ enhances neural stem cell proliferation and oligodendrocyte differentiation. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 98, n. 2, p. 240–245, abr. 2015.

SMITH, K. E.; POLLAK, S. D. Estrés y desarrollo en la vida temprana: mecanismos potenciales para resultados adversos. **Journal of Neurodevelopmental Disorders**, v. 12, n. 1, p. 34, 2020.

SOSA, M.; GIOCOMO, L. M. Navigating for reward. v. 22, n. 8, p. 472–487, 2022.

STOLBERG, V. B. A review of perspectives on alcohol and alcoholism in the history of American health and medicine. **Journal of Ethnicity in Substance Abuse**, v. 5, n. 4, p. 39–106, 2006.

SUBBANNA, S.; BASAVARAJAPPA, B. S. brain sciences Binge-like Prenatal Ethanol Exposure Causes Impaired Cellular Differentiation in the Embryonic Forebrain and Synaptic and Behavioral Defects in Adult Mice. n. Cdc, 2022.

SULIK, K. K. **Fetal alcohol spectrum disorder: Pathogenesis and mechanisms**. 1. ed. [s.l.] Elsevier B.V., 2014. v. 125

SULLIVAN, W. C. A note on the influence of maternal inebriety on the offspring. **International Journal of Epidemiology**, v. 40, n. 2, p. 278–282, 2011.

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. **Behavioural Brain Research**, v. 356, n. January, p. 470–482, 2019.

TARELO-ACUÑA, L.; OLVERA-CORTÉS, E.; GONZÁLEZ-BURGOS, I. Prenatal and postnatal exposure to ethanol induces changes in the shape of the dendritic spines from hippocampal CA1 pyramidal neurons of the rat. **Neuroscience Letters**, v. 286, n. 1, p. 13–16, 2000.

TATU, L.; VUILLIER, F. Structure and vascularization of the human hippocampus. **The Hippocampus in Clinical Neuroscience**, v. 34, p. 18–25, 2014.

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.

TURNER, K. M. et al. Cognitive performance and response inhibition in developmentally vitamin D (DVD)-deficient rats. **Behavioural Brain Research**, v. 242, n. 1, p. 47–53, 2013.

VILAR, M.; MIRA, H. Regulation of neurogenesis by neurotrophins during adulthood: Expected and unexpected roles. **Frontiers in Neuroscience**, v. 10, n. FEB, p. 1–9, 2016.

WARD, R. J.; COUTELLE, C. Women and alcohol susceptibility: Could differences in alcohol metabolism predispose women to alcohol-related diseases? **Archives of Women's Mental Health**, v. 6, n. 4, p. 231–238, 2003.

WATTENDORF, D. J.; MUENKE, M. Fetal alcohol spectrum disorders. **American Family Physician**, v. 72, n. 2, 2005.

WILMOUTH, C. E.; SPEAR, L. P. Hedonic sensitivity in adolescent and adult rats: Taste reactivity and voluntary sucrose consumption. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 92, n. 4, p. 566–573, 2009.

WISE, R. A. THE ROLE of REWARD PATHWAYS in THE DEVELOPMENT of DRUG Dependence. v. 35, p. 227–263, 1987.

WOZNIAK, J. R.; RILEY, E. P.; CHARNESS, M. E. Clinical presentation, diagnosis, and management of fetal alcohol spectrum disorder. **The Lancet Neurology**, v. 18, n. 8, p. 760–770, 2019.

WRZOSEK, M. et al. Vitamin D and the central nervous system. **Pharmacological Reports**, v. 65, n. 2, p. 271–278, 2013.