



UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI-URCA
PRÓ – REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA - PRPGP
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOPROSPECÇÃO MOLECULAR-PPBM

ADRIANA TAVARES DA SILVA

EFEITOS DA INGESTÃO DO ETANOL A PARTIR DOS PERÍODOS PRÉ E PÓS-NATAL, SOBRE A MORFOLOGIA DE NÚCLEOS DA RAFE DE CAMUNDONGOS.

CRATO - CE

2018

ADRIANA TAVARES DA SILVA

EFEITOS DA INGESTÃO DO ETANOL A PARTIR DOS PERÍODOS PRÉ E PÓS-NATAL, SOBRE A MORFOLOGIA DE NÚCLEOS DA RAFE DE CAMUNDONGOS.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri, como requisito para obtenção do título de mestre em Bioprospecção Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Gilberto Oliveira

Co-orientador: Prof. Dr. Expedito Silva do Nascimento Junior.

CRATO – CE

2018

ADRIANA TAVARES DA SILVA

EFEITOS DA INGESTÃO DO ETANOL A PARTIR DOS PERÍODOS PRÉ E PÓS-NATAL, SOBRE A MORFOLOGIA DE NÚCLEOS DA RAFE DE CAMUNDONGOS.

Dissertação de mestrado

Aprovada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Francisco Gilberto Oliveira (Orientador)
Universidade Regional do Cariri-URCA

Prof. Dr. Fernando Vagner Lobo Ladd (Membro Externo)
Universidade Federal do Rio Grande do Norte-UFRN

Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho (Membro Interno)
Universidade Regional do Cariri-URCA

CRATO-CE

2018

DEDICATÓRIA

Com muito amor e carinho a minha família (meu **pai João**, meus **irmãos Sérgio, Aderlânia, Wilha e Wélia**, e minha **avó Antônia**). E de modo especial a duas pessoas extremamente importantes para a minha formação acadêmica e na vida, a minha **mãe (Necilda)** e ao meu orientador, professor e acima de tudo um grande amigo **Prof. Gilberto Oliveira**; sem os quais eu não teria conseguido dar sequer um único passo em direção à concretização dos meus objetivos e sonhos.

AGRADECIMENTOS

O momento é de imensa gratidão! Primeiramente a **Deus** pelo dom da vida, e por nunca ter me deixado sozinha ao longo desta tão bela caminhada, a minha família por tudo que sou e sei e a todos os anjos que encontrei pelo caminho a quem carinhosamente chamo de amigos (graças a Deus, são muitos!), cada um à sua maneira e ao seu tempo teve a sua parcela de contribuição para cada passo dado e cada momento de conquista. Sou grata a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste sonho.

De modo especial, agradeço a minha **mãe (Necilda)** e a minha **avó (Antônia)** pela compreensão, carinho e pelas tão calorosas palavras de incentivo e orações, sendo sempre o meu alicerce e força para não desistir.

A **minha irmã** que amo tanto (**Wélia**), por estar sempre me apoiando e incentivando, e por me escutar nos momentos de angústia.

Agradeço aos meus colegas de curso por compartilhar momentos de ansiedade, apreensão e também de muitas alegrias. Dentre estes, de modo especial agradeço a minha **amiga/irmã Joycy** que juntamente com a sua família me recebeu e acolheu com muito amor e carinho na sua casa, me fazendo sentir como se estivesse na minha própria casa e ainda a **Dona Francinete (mãe neta)** por todo amor, carinho, e cuidado com que sempre me tratou. E a **Andressa** pelo apoio que me deu durante a realização de algumas etapas dos experimentos.

Agradeço aos professores :**Prof^a. Marta, Prof^a. Roseli, Prof. Irwin e Prof. Waltécio**, e suas respectivas equipes, todos vocês foram muito importantes para que eu pudesse realizar os meus experimentos com sucesso.

Agradeço aos meus amigos, **Luiz, Gyllyandeson, Denise, Damon, João Filho, Lidia, Rayane, Elaine, Daniel e Josyane**, sem o apoio de vocês tudo teria sido mais difícil.

Agradeço as minhas amigas do laboratório de anatomia **Andreia e Michele**, por todo o apoio que me foi dado.

Agradeço aos membros da banca examinadora pelas sugestões pontuais e pertinentes, que contribuíram para o enriquecimento do presente trabalho.

Agradeço a toda equipe do **Laboratório de Neuroanatomia (LABNEURO)**, da **Universidade Federal do Rio Grande do Norte-UFRN** pela disponibilização da infraestrutura necessária, dando totais condições para a execução de parte da pesquisa.

A **Comissão de Ética no Uso de Animais-CEUA** pela confiabilidade da execução do projeto e pela a autorização da realização do mesmo.

A **Universidade Regional do Cariri-URCA** pelo espaço e por contribuir significativamente com a minha formação acadêmica.

E a **Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico - FUNCAP** pelo apoio financeiro.

“Agradeço todas as dificuldades que enfrentei; não fosse por elas, eu não teria saído do lugar. As facilidades nos impedem de caminhar.

Mesmo as críticas nos auxiliam muito”

— Chico Xavier.

RESUMO

A ingestão de bebidas alcoólicas durante a gravidez é atualmente a principal causa de teratogênias em todo o mundo, sendo considerado um sério problema de saúde pública nacional e internacional. Cerca de 10% das mulheres na população mundial consomem bebidas alcoólicas durante a gravidez. Quando ingerido durante a gravidez ou amamentação, o álcool (ETOH) pode provocar danos permanentes no sistema nervoso central (SNC) da prole. Dependendo da quantidade e do período de desenvolvimento em que ocorre a exposição, a ingestão de ETOH na gravidez pode desencadear distúrbios físicos, comportamentais, cognitivos e psicossociais que caracterizam a Síndrome Alcoólica Fetal (SAF). Durante o desenvolvimento o ETOH interage e provoca danos no sistema serotoninérgico, alterando respostas fisiológicas e comportamentais. No tronco encefálico estão localizados os núcleos da rafe que contém neurônios secretores de serotonina (5-HT). Este neurotransmissor, juntamente com os seus receptores são responsáveis pela modulação comportamental no controle alimentar, do humor, no ciclo sono e vigília, termorregulação, sensibilidade à dor, e participa de processos de desenvolvimento e plasticidade no SNC. Objetivou-se investigar os efeitos da exposição crônica do ETOH na imunorreatividade dos núcleos Dorsal (DR) e Mediano da Rafe (MnR), assim como, sobre o peso corporal e encefálico da prole de camundongos, cujas mães foram expostas ao ETOH a 15% (v/v), ad libitum, durante a gestação e/ou lactação. Foram empregados métodos de Nissl, imunoistoquímico e análise da densidade óptica relativa (DOR). Observou-se uma diminuição na imunorreatividade serotoninérgica (5-HT-IR), confirmada pela análise da DOR, nos núcleos DR e MnR dos grupos alcóolicos ($p \leq 0,0001$), em relação ao controle. Quando comparados os grupos alcóolicos entre si, nota-se reduções significativas na DOR do DR para as proles do grupo EtL ($p \leq 0,05$) em relação ao EtG, e no MnR do EtL ($p \leq 0,001$) e ($p \leq 0,01$) comparados ao EtG e EtGL respectivamente. Após o desmame, observou-se perda de peso corporal apenas para os grupos EtL e EtGL ($p \leq 0,0001$) em relação ao controle; e aos 34/36 dias a redução de peso corporal persistiu para o EtL ($p \leq 0,01$) comparado ao controle, e ($p \leq 0,001$) em relação ao EtG. Observou-se ainda redução do peso encefálico do grupo EtL ($p \leq 0,5$) em relação ao controle, e do EtL e EtGL ($p \leq 0,01$) em relação a EtG. Nossos resultados demonstram que o consumo de dietas líquidas contendo ETOH a 15%, por gestantes e/ou lactantes repercute sobre a prole, causando prejuízos para o desenvolvimento dos neurônios 5-HT nos núcleos DR e MnR da rafe, e sobre o peso corporal e encefálico durante o período pós-natal.

Palavras-chave: Etanol; Gravidez; Lactação; Núcleos da rafe; Serotonina.

ABSTRACT

Alcohol consumption during human pregnancy is currently a leading cause of teratogenies around the world, and is considered a serious problem of national and international public health. About 10% of women in the world's population consume alcohol during pregnancy. When ingested during pregnancy or breastfeeding, alcohol (ETOH) can cause permanent damage in the central nervous system (CNS) of the offspring. Depending on the amount and period of development when exposure occurs, ETOH intake in pregnancy can trigger physical disorders, behavioral, cognitive and psychosocial alterations that characterize the Fetal Alcohol Syndrome (SAF). During development the ETOH interacts and causes damage to the serotonergic system, changing behavioral and physiological responses. In the brainstem are located the raphe nuclei containing secretory neurons of serotonin (5-HT). This neurotransmitter, along with its receptors are responsible for behavioral modulation in food control, mood, sleep and wake cycle, thermoregulation, sensitivity to pain, and participates in developmental processes and plasticity in the CNS. Aimed to investigate the effects of chronic exposure of ETOH in immunoreactivity of the Dorsal nucleus (DR) and Median Raphe (MnR), as well as on the body weight and injury of the offspring of mice whose mothers were exposed to ETOH to 15% (v/v), ad libitum, during pregnancy and/or lactation. Nissl, immunohistochemical methods and analysis of relative optical density (ROD) were used. There was a decrease in serotonergic immunoreactivity (5-HT-IR), confirmed by the analysis of the ROD, in the DR and MnR nuclei of the alcoholic groups ($p \leq 0.0001$), relative to the control. When comparing the alcoholic groups with each other, there were significant reductions in the ROD of the DR for the offspring of the EtL group ($p \leq 0.05$) in relation to the EtG, and in the MnR of the EtL ($p \leq 0.001$) and ($p \leq 0.01$) compared to EtG and EtGL respectively. After weaning, body weight loss was observed only for the EtL and EtGL groups ($p \leq 0.0001$) in relation to the control; and at 34/36 days body weight reduction persisted for EtL ($p \leq 0.01$) compared to control, and ($p \leq 0.001$) for EtG. There was also a reduction in the encephalic weight of the EtL group ($p \leq 0.5$) in relation to the control, and of EtL and EtGL ($p \leq 0.01$) in relation to EtG. Our results demonstrate that the consumption of liquid diets containing 15% ETOH by pregnant and / or lactating mothers affects the offspring, causing damage to the development of 5-HT neurons in rafe DR and MnR nuclei, and on body weight and encephalic period during the postnatal period.

Keywords: Ethanol; Pregnancy; Lactation; Raphe nuclei; Serotonin.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Tabela 1	Prevalência global do consumo de álcool (qualquer quantidade) durante a gravidez e síndrome de alcoolismo fetal (SAF) na população em geral em 2012, por região, de acordo com a OMS. Os dados são estimativas de prevalência (IC 95%). AFR = região africana. AMR = Região das Américas. EMR = região leste-mediterrânea. EUR = região europeia. FAS = síndrome do alcoolismo fetal. SEAR = região do Sudeste Asiático. WPR = região do Pacífico Ocidental.....	20
Figura 1	Sintomas psicológicos encontrados em crianças expostas ao consumo moderado de álcool materno.....	22
Figura 2	Caraterísticas faciais associadas à exposição alcoólica fetal.....	23
Figura 3	Potenciais locais de ação da exposição ao etanol no desenvolvimento de sistemas de neurotransmissores.....	29
Figura 4	Sistema modulatório serotoninérgico de projeção difusa originário dos núcleos da rafe.....	30
Figura 5	Síntese de serotonina (5-HT) a partir do aminoácido triptofano.....	31
Figura 6	Esquema que mostra uma visão lateral de um embrião de mamífero de meia gestação, no estágio inicial do tubo neural (rato E10), evidenciando a localização aproximada dos núcleos serotoninérgicos.....	33
Figura 7	Grupamentos serotoninérgicos B1 a B9 segundo Dahlstrom e Fuxe, (1964)	35
Figura 8	Núcleos da rafe. Paxinos e Watson, (2007)	36
Tabela 2	Especificações do anticorpo primário, anticorpo secundário e soro normal utilizados no procedimento imunoistoquímico com as suas referidas diluições e fabricantes.....	48
Figura 9	Fotomicrografia em campo claro de secção coronal no sentido rostrocaudal corada pelo método de Nissl (A), e representação esquemática ilustrando a distribuição dos núcleos dorsal (DR) e Mediano (MnR) da rafe em um nível mais caudal (B). Barra: 500 µm.	50
Figura 10	Fotomicrografia em campo claro de secções coronais no sentido rostrocaudal com representação esquemática do DR e MnR em um plano rostral (A) e caudal (B); os balões indicados pelas setas representam uma magnificação da área destes núcleos, marcados pelo método de imunoistoquímica para 5-HT. Aq : aqueduto cerebral. DRL : parte lateral do núcleo dorsal da rafe. DRD : parte dorsal do núcleo dorsal da rafe. DRV : parte ventral do núcleo dorsal da rafe. DRI : parte interfascicular do núcleo dorsal da rafe PDR : núcleo póstero dorsal da rafe. XSCP :	

decussação do pedúnculo cerebelar superior, **MnR**: núcleo mediano da rafe e **PMnR**: núcleo paramediano da rafe. Barra de calibragem=500 μ m

51

Figura 11 Fotomicrografia em campo claro de secções coronais no sentido rostrocaudal do DR (rostral), coradas pelo método de imunoistoquímica para 5-HT de animais **A** e **E**: Controle, **B** e **F**: EtG, **C** e **G**: EtL, **D** e **H**: EtGL. **Aq**: aqueduto. **DRL**: parte lateral do núcleo dorsal da rafe. **DRD**: parte dorsal do núcleo dorsal da rafe. **DRV**: parte ventral do núcleo dorsal da rafe. **DRI**: parte interfascicular do núcleo dorsal da rafe **PDR**: núcleo pósterodorsal da rafe. Barra = 100 μ m.....

53

Figura 12 Densidade óptica relativa (DOR) dos neurônios imunorreativos à 5-HT no DR (rostral/caudal). As colunas representam a média \pm E.P.M., analisados através da ANOVA *two-way* ($p < 0,05$), seguida pelo teste de *Bonferroni* e teste 't' *post hoc*. Valores significativos "*" ($p < 0,05$) e "****" ($p \leq 0,0001$), demonstram as comparações entre as médias do grupo controle em relação aos grupos alcoólicos (ETOH 15%), EtG, EtL, e dos grupos alcoólicos entre si.....

54

Figura 13 Fotomicrografia em campo claro de secções coronais no sentido rostrocaudal do MnR, coradas pelo método de imunoistoquímica para 5-HT de animais **A**: Controle, **B**: EtG, **C**: EtL, **D**: EtGL. **MnR**: núcleo mediano da rafe, **PMnR**: núcleo paramediano da rafe e **ts**: trato tectoespinal. Barra = 100 μ m.....

55

Figura 14 Densidade óptica relativa (DOR) dos neurônios imunorreativos a 5-HT no MnR (rostral/caudal). As colunas representam a média \pm E.P.M., analisados através da ANOVA *two-way* ($p < 0,05$), seguida pelo teste de *Bonferroni* e teste 't' *post hoc*. Valores significativos "*" ($p < 0,01$), "****" ($p < 0,001$) e "*****" ($p \leq 0,0001$), demonstram as comparações entre as médias do grupo controle, em relação aos grupos alcoólicos (ETOH 15%), EtG, EtL, EtGL e dos grupos alcoólicos entre si.....

55

Figura 15 Massa corporal aos 21 dias (pós desmame) e aos 34/36 dias (perfusão). As colunas representam a média \pm E.P.M., analisados através da ANOVA *two-way* ($p < 0,05$), seguida pelo teste de *Bonferroni* e teste 't' *post hoc*. Valores significativos "*" ($p < 0,01$), "****" ($p < 0,001$) e "*****" ($p \leq 0,0001$), demonstram as comparações entre as médias do grupo controle, em relação aos grupos alcoólicos (ETOH 15%), EtG, EtL, EtGL e dos grupos alcoólicos entre si.....

56

Figura 16 Massa encefálica aos 34/36 dias. As colunas representam a média \pm E.P.M., analisados através da ANOVA *two-way* ($p < 0,05$), seguida pelo teste de *Bonferroni* e teste 't' *post hoc*. Valores significativos "*" ($p < 0,05$) e "****" ($p < 0,01$), demonstram as comparações entre as médias do grupo controle, em relação aos grupos alcoólicos (ETOH 15%), EtG, EtL, EtGL e dos grupos alcoólicos entre si.....

57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HIAA - Ácido 5-hiroxiindolacético

5-HT - 5-hidroxitriptamina

5-HT-IR - Neurônios 5-HT imunorreativos

5-HTP - 5-hidroxitriptofano

5-HTT-IR- Fibras transportadoras de 5-HT imunorreativas

5-HTT- Transportador de 5-HT

ABC - Complexo Avidina-Biotina Peroxidase

ADH - Álcool Desidrogenase

ARND-Desordens de Neurodesenvolvimento Relacionadas ao Álcool (*Alcohol-related Neurodevelopmental Disorders*)

BDNF - Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro

CISA - Centro de Informações Sobre Saúde e Álcool

CLi – Núcleo Linear Caudado da Rafe

DR - Núcleo Dorsal da Rafe

EtG - Grupo submetido ao tratamento com ETOH a partir do acasalamento

EtGL - Grupo submetido ao tratamento com ETOH durante a gestação e lactação

EtL - Grupo submetido ao tratamento com ETOH a partir da lactação

ETOH - Etanol

FASD - Distúrbios do Espectro Alcoolico Fetal (*Fetal alcohol spectrum disorders*)

FIG - Folheto Intergeniculado

GABA - Ácido Gamaminobutírico

Kda - kilodalton

MAO A - Monoaminoxidase A

MnR - Núcleo Mediano da Rafe

NMDA - N-metil-D-aspartato

NSQ - Núcleo Supraquiasmático

pCPA - ácido-4-clorofenoxiacético

PMnR - Núcleo Para-Mediano da Rafe

PnR - Núcleo Pontino da Rafe

REM- Rapid Eye Movement

RIP - Núcleo Interpósito da Rafe

RLi - Núcleo Linear Rostral da Rafe

RMg - Núcleo Magno da Rafe

ROb - Núcleo Obscuro da Rafe

RPa - Núcleo Pálido da Rafe

SAF - Síndrome Alcoólica Fetal

SNC- Sistema Nervoso Central.

S100 β – Fator de crescimento astrogial

TF - Tampão Fosfato

WHO - World Health Organization

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1	Alcoolismo feminino/materno e suas implicações.....	17
2.2	Alcoolismo e gravidez.....	19
2.3	Alcoolismo e lactação.....	23
2.4	Consumo de ETOH durante o desenvolvimento do SNC.....	26
2.5	Sistema serotoninérgico.....	30
2.6	Núcleos serotoninérgicos da rafe e suas projeções.....	34
2.7	Receptores serotoninérgicos e o desenvolvimento do cérebro.....	37
3	OBJETIVOS.....	41
3.1	Objetivo geral.....	41
3.2	Objetivos específicos.....	41
4	METODOLOGIA.....	42
4.1	Animais.....	42
4.2	Protocolo experimental.....	42
4.2.1	Acasalamento.....	42
4.2.2	Coleta do lavado vaginal.....	43
4.2.3	Acasalamento programado.....	43
4.2.4	Grupos experimentais e dietas.....	44
4.2.5	Peso corporal e encefálico.....	45
4.2.6	Anestesia.....	45
4.2.7	Perfusão.....	45
4.2.8	Remoção dos encéfalos.....	46
4.2.9	Microtomia.....	46
4.2.10	Marcação de Nissl e Imunoistoquímica.....	46
4.2.11	Montagem de lâminas e intensificação com Tetróxido de Ósmio.....	47
4.2.12	Obtenção e análise de imagens.....	48
4.2.13	Densidade óptica relativa.....	48
4.2.14	Análise estatística.....	49
5	RESULTADOS.....	50
6	DISCUSSÃO.....	58
7	CONCLUSÕES.....	68
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69
	APÊNDICE	

1 INTRODUÇÃO

O alcoolismo gestacional tem se tornado um sério problema de saúde pública, apresentando um aumento frequente na sua prevalência (WILLIAMS; SMITH, 2015; POPOVA et al., 2017). O uso, abuso e dependência de ETOH são mais frequentes em homens do que entre mulheres, mas essa diferença vem diminuindo ao longo dos anos. Alguns fatores como as características biológicas, psicológicas e psicossociais podem estar relacionados ao aumento no consumo e dependência de ETOH pelo gênero feminino (PECHANSCKY et al., 2017).

Em sua fase inicial, a ingestão de ETOH provoca sensações de prazer e bem-estar. Com o passar do tempo, o organismo torna-se dependente, passando a exigir um consumo regular de ETOH para manter as sensações agradáveis, o que aumenta os efeitos colaterais deletérios no sistema nervoso (GUEDES; BEZERRA; ABADIE-GUEDES, 2016), além do que, pode resultar em ações tóxicas sobre órgãos e tecidos, desencadeando mecanismos lesionais associados a diferentes patologias que afetam a saúde do indivíduo (TESTINO; BORRO, 2010; RHEM, 2011; JANVALE; KENDRE; MEHROTA, 2014).

A exposição pré-natal ao ETOH pode causar danos ao feto em desenvolvimento e tem sido constatado ser a principal causa evitável de defeitos congênitos, intelectual e deficiências do desenvolvimento neurológico, por causar grandes efeitos deletérios, o que leva a uma série de anormalidades físicas e cognitivas em crianças, com repercussão na idade adulta (MATTSON; SCHOENFELD; RILEY, 2011; WILLIAMS; SMITH, 2015). Jones e Smith (1973) consideraram que a soma destes distúrbios, constitui uma síndrome e a denominaram de Síndrome Alcoólica Fetal (SAF), e que a expressão mais elevada das teratogênias está relacionada ao uso elevado do ETOH.

A amplitude destas anormalidades varia de acordo com fatores biológicos e ambientais, como a quantidade e a frequência de ETOH ingerido pela gestante, período da gestação exposto ao ETOH, idade materna junto com fatores genéticos, nutricionais e físicos, além do histórico de uso de outras drogas (GARCIA; ROSSI; GIACHETI, 2007).

Estudos experimentais em animais (BURGOS et al., 2004) e em seres humanos (BACKSTRAND et al., 2004) relacionados ao consumo de ETOH por lactantes, sugerem que a ingestão de bebidas alcoólicas durante a lactação afeta o metabolismo materno, repercutindo no metabolismo e desenvolvimento dos recém-nascidos. Os efeitos da exposição pós-natal ao ETOH através da amamentação ainda não foram tão examinados quanto aqueles do período

pré-natal, e a literatura que trata da prevalência do consumo de ETOH durante a amamentação é escassa (HAASTRUP; POTTEGARD; DAMKIER, 2014; DUMAS; TOUTAIN; SIMMAT-DURAND, 2017).

Durante o desenvolvimento, o sistema serotoninérgico é afetado pelo ETOH, através da redução do número de neurônios que sintetizam 5-HT e dos níveis de 5-HT, que além de agir como um neurotransmissor promove o crescimento neuronal, a diferenciação, a migração e a formação de sinapses (DRUSE et al., 2004; VALENZUELA; PUGLIA; ZUCCA, 2011), influenciando a embriogênese, agindo como um fator neurotrófico (DERIÓ et al., 2008; FEIJÓ et al., 2011). Além disso, desempenha múltiplas ações fisiológicas, como o controle da saciedade, da temperatura corporal, estresse, regulação do sono, controle de secreção hormonal, atividade física, atividade psíquica e sensibilidade à dor (FEIJÓ et al., 2011).

Neste contexto, há um interesse crescente por estudos relacionados ao consumo de ETOH, uma vez que este pode desencadear diferentes efeitos que induzem danos ao desenvolvimento embrionário e fetal e que, dependendo do tempo e da fase de exposição, contribuir para a variabilidade dos resultados observados em todo espectro alcoólico fetal (WARREN; HEWITT; THOMAS, 2011), além da repercussão social e econômica que o seu uso abusivo acarreta (LOPES et al., 2015; CISA, 2018).

Tem sido demonstrado que o consumo do ETOH durante a gravidez, mesmo em doses moderadas ou baixas, pode provocar alterações, ainda que sutis, na personalidade e no comportamento, inclusive humano (COMASCO et al., 2017). Nesse contexto, acreditamos que o sistema serotoninérgico, notadamente os núcleos DR e MnR da rafe irão apresentar alteração na sua morfologia, com redução na sua imunorreatividade.

Dessa forma, considerando o amplo espectro de efeitos teratogênicos provocados pela exposição ao ETOH durante o desenvolvimento, bem como a multiplicidade de ações da 5-HT, nos motivamos a buscar uma melhor compreensão do sistema serotoninérgico na prole de um modelo animal submetido à ingestão de ETOH durante os períodos de gravidez e aleitamento materno.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Alcoolismo feminino/materno e suas implicações

Dados do II Levantamento Nacional de Álcool e Drogas-LENAD demonstram, que as mulheres brasileiras têm iniciado o consumo de bebidas alcoólicas mais precocemente e ingerido quantidades mais elevadas. A idade de experimentação quando comparados os anos de 2006 e 2012, na faixa etária dos 12 aos 14 anos, aumentou de 7% para 13%, e dos 15 aos 17 anos, de 28% para 32%; e a proporção de mulheres que consomem cinco doses ou mais aumentou de 17% em 2006, para 27% em 2012, representando 38% das pessoas que consumiram ETOH em 2012 (LARANJEIRA, 2014).

O aumento do consumo de bebidas alcoólicas entre mulheres pode ter influência sobre os dados de estudos recentes que tratam do consumo deste tipo de bebidas pela população brasileira (WHO, 2017). Em 2006, cada brasileiro a partir de 15 anos bebia o equivalente a 6,2 litros de ETOH puro por ano, e em 2016 passou para 8,9, superando a média mundial (6,4L per capita) (WHO, 2017).

Diante destes dados, é importante salientar que o consumo de bebidas alcoólicas é tolerado pela sociedade, e como na sociedade moderna a mulher tem um estilo de vida diferente dos de gerações passadas, o consumo de ETOH entre mulheres em idade reprodutiva aumentou (BUCHER, 2015).

Alguns fatores podem ter contribuído, como a inserção no mercado de trabalho, o acúmulo de papéis sociais e a elevação do estresse, associado às diferenças biológicas entre os gêneros, como maior proporção de gordura corpórea e menor quantidade de água (51% mulheres e 65% homens). As mulheres geralmente pesam menos e possuem níveis menores de álcool desidrogenase (ADH), enzima responsável pela primeira etapa de metabolização do ETOH no fígado (PECHANSCKY et al., 2017; CISA, 2018). Isso faz com que, quando consumidas as mesmas quantidades de bebidas alcoólicas que os homens, elas apresentem níveis mais elevados de ETOH no sangue e demorem mais tempo para metabolizá-lo, e ainda devido a fatores hormonais, o seu efeito se torne mais prazeroso para as mulheres (PECHANSCKY et al., 2017).

Na América Latina, apesar do aumento crescente no consumo de bebidas alcoólicas pelo sexo feminino, o número de pesquisadores interessados na abordagem do tema, ainda era bastante reduzido (MONTEIRO, 1996), e apesar de desde a antiguidade haver referências às

consequências da exposição fetal ao ETOH, somente a partir do início do século XXI foi que os estudos sobre alcoolismo feminino passaram a ser realizados em linhas de pesquisa, tornando-se frequentes nas publicações científicas (ZILBERMA; TAVARES; ANDRADE, 2003; BRASILIANO; HOCHGRAF, 2005; ZILBERMA; BLUME, 2005).

O ETOH, sob a forma de bebidas (vinho, cerveja, uísque, gin, vodka, licor, etc.), é o vetor mais relevante de retardo mental nos filhos de mães alcoolistas e o principal responsável por teratogênias no mundo ocidental (GRINFELD, 2010). Mesmo em registros históricos de civilizações mais antigas (Grécia e Roma), são encontrados relatos sobre a associação entre abuso de ETOH na gestação e desenvolvimento fetal, como a incidência aumentada de abortos, natimortos e malformações congênitas em recém-nascidos (LEMOINE et al., 1968). Textos bíblicos também comentam sobre a importância da abstinência desta substância durante a gravidez, como por exemplo, em “Juízes 13:3,4”, quando um anjo avisa a futura mãe de Sansão para ela não beber durante este período (GILBERT, 2011).

Em meados do século XVIII, na Inglaterra, o consumo do *gin* disseminou-se na sociedade sendo consumido por homens e mulheres. Nesse período, os médicos descreveram as crianças nascidas de mães consumidoras habituais como crianças fracas, débeis e desatentas, alertando para o perigo do consumo de bebidas alcoólicas durante a gravidez, porém, a sociedade interpretou estas informações como moralistas, associando tais problemas a causas que também faziam as mães beberem (WARNER; ROSETT, 1975).

Posteriormente, durante o século XIX e início do século XX, estudos foram realizados no sentido de estabelecer-se uma relação entre o consumo de ETOH e alterações a nível do desenvolvimento fetal. No entanto, só no final da década de 60 e início dos anos 70 foi que os efeitos nefastos do ETOH na gravidez voltaram a ter grande interesse na comunidade científica (MATTSON; RILEY; 1998). Em 1968 foram publicados os resultados de um dos primeiros estudos sobre filhos de mães alcoólicas, sendo descritas características físicas bastante específicas nestas crianças (LEMOINE et al., 1968). Contudo, só com a publicação de um trabalho realizado por Jones e Smith (1973), foi que a comunidade científica mundial despertou para a problemática, onde o espectro do efeito teratogênico do ETOH passou a ser denominado como SAF.

Com o aumento do interesse sobre o tema e consequente investigação, pesquisas possibilitaram perceber que os efeitos sobre o feto resultantes da exposição ao ETOH são de uma extensa complexidade e amplo espectro, dificultando muitas vezes a suspeita clínica e o

diagnóstico, devido à variedade de aspectos clínicos e comportamentais associados (GRINFELD, 2010).

Na maioria das vezes as mulheres não percebem que estão grávidas até entre quatro e seis semanas de gestação, e por isso, muitas delas acabam consumindo bebidas alcoólicas durante esse período (KAUP; MERIGHI; TSUNECHIRO, 2001; BOSCO; DIAZ, 2012). Provavelmente, um dos fatores agravantes para esta situação seja a falta de planejamento familiar, uma vez que, de acordo com o Fundo de Populações das Nações Unidas-UNFPA, do total de nascimentos ocorridos nos últimos anos, apenas 54% foram planejados para aquele momento. Entre os 46% restantes, 28% eram desejados para mais tarde e 18% não eram desejados (UNFPA, 2016).

O reconhecimento tardio da gravidez, e o consumo de bebidas alcoólicas, tem como consequência a ingestão de ETOH durante o primeiro trimestre, o que tem sido comumente associado ao comportamento desordenado e desenvolvimento cognitivo prejudicado, observado em crianças com SAF ou Distúrbios do Espectro Alcoólico Fetal (FASD) (WILLFORD et al., 2004).

Os efeitos neuropsicológicos da exposição pré-natal ao ETOH não melhoram com a idade (COMASCO et al., 2017). Indivíduos com diagnóstico de SAF mostram funções cognitivas e executivas reduzidas e deterioração da cognição social persistente na idade adulta (RANGMAR et al., 2015b). Os adultos com SAF recebem educação especial, são propensos a ficarem desempregados, recebem pensão por invalidez, apresentam taxas mais elevadas para transtornos psiquiátricos e foram prescritas drogas psicotrópicas ao longo da vida em maior medida do que a maioria de seus pares (RANGMAR et al., 2015a). Estes resultados indicam que, seja de uma perspectiva econômica, social, educacional, familiar, de saúde ou médica, a SAF representa um grande fardo para a saúde pública (WARREN; HEWITT, 2009).

2.2 Alcoolismo e gravidez

A quantidade segura de ETOH que uma gestante pode consumir não está definida na literatura, por isto recomenda-se abstinência total durante toda a gravidez, haja vista, haver uma indicação de que a exposição a níveis baixos ou moderados de ETOH durante a vida intrauterina pode produzir alterações agudas e de longo prazo no cérebro em desenvolvimento (WILLIANS; SMITH; VICENTE, 2015; COMASCO et al., 2017). No entanto, um estudo recente (POPOVA et al., 2017), aponta que mundialmente, cerca de 10% das mulheres na

população em geral consomem ETOH durante a gravidez, e que em média uma em cada 67 mulheres teve uma criança com SAF (Tabela 1). Através destes dados, este estudo estima que em média, em torno de 15, de cada 10.000 pessoas em todo o mundo terá SAF, ou seja, cerca de 119.000 crianças nascidas com SAF globalmente todos os anos.

A elevada proporção no consumo de ETOH pelas mulheres da região europeia durante a gravidez se reflete na maior prevalência de SAF, que é 2,6 vezes maior do que a média global (POPOVA et al., 2017).

Tabela 1. Prevalência global do consumo de álcool (qualquer quantidade) durante a gravidez e síndrome de alcoolismo fetal (SAF) na população em geral em 2012, por região, de acordo com a OMS. Os dados são estimativas de prevalência (IC 95%). AFR = região africana. AMR = Região das Américas. EMR = região leste-mediterrânea. EUR = região europeia. FAS = síndrome do alcoolismo fetal. SEAR = região do Sudeste Asiático. WPR = região do Pacífico Ocidental. **Fonte:** Adaptado de POPOVA et al., 2017.

	Uso de ETOH durante a gravidez (%)	SAF (POR 10 000)
AFR	10,0% (8,5 – 11,8)	14,8 (8,9 – 21,5)
AMR	11,2% (9,4 – 12,6)	16,6 (11,0 – 24,0)
EMR	0,2% (0,1 – 0,9)	0,2 (0,2 – 0,9)
EUR	25,2% (21,6 – 29,6)	37,4 (24,7 – 54,2)
SEAR	1,8% (0,9 – 5,1)	2,7 (1,3 – 8,1)
WPR	8,6% (4,5 – 11,6)	12,7 (7,7 – 19,4)
Em todo o mundo	9,8% (8,9 – 11,1)	14,6 (9,4 – 23,3)

Dois fatores contribuem para a participação do ETOH na gênese das alterações observadas na SAF: a capacidade do ETOH de provocar lesões em quase todos os sistemas do organismo e a passagem livre desta substância pela barreira placentária (SCIVOLETTO; MALBERGIER, 2003). O ETOH cruza a barreira placentária livremente, por ter peso molecular entre 600 e 1000 Kda, e propriedades de dissociação e polarização, sendo solúvel em água e em solventes não polares, o que faz com que possa atravessar as membranas celulares e difundir-se em todos os líquidos e tecidos do organismo (RIBEIRO; GONZALEZ, 1995; STREISSGUTH et al., 1996).

A difusão do ETOH ocorre através do fluxo sanguíneo placentar, segundo um gradiente de concentração. Ao cruzar a placenta pelo sangue materno, o ETOH vai para o líquido amniótico e para o feto e, em cerca de 1 hora, os níveis de ETOH no sangue fetal e no líquido amniótico são equivalentes aos do sangue da grávida (RIBEIRO; GONZALEZ, 1995; BURD et al., 2007). No entanto, o efeito tóxico no feto é muito mais exacerbado, uma vez que nesse,

não está totalmente estabelecida a função hepática. Consequentemente, o ETOH atinge concentrações sanguíneas mais elevadas no feto que na mãe. Apesar do acetaldeído derivado do metabolismo materno também cruzar a placenta, e sua concentração tornar-se elevada e mais tóxica pela formação insuficiente da enzima aldeído-desidrogenase hepática na vida fetal (BRODY, 1998), estudo realizado em ratas prenhes através da inibição do metabolismo do ETOH e o consequente aumento da exposição fetal, sugere que é o ETOH e não os seus metabólitos, que causam a embriotoxicidade (SHANKAR; RONIS; BADGER, 2007).

O principal mecanismo de eliminação do ETOH fetal acontece primordialmente pela reentrada na circulação materna. Como a mãe metaboliza o ETOH, a concentração deste irá descendo ao longo do tempo na sua circulação sanguínea. Contudo, como o feto não tem capacidade de metabolização do ETOH, já que não possui a enzima ADH, a concentração alcoólica fetal manter-se-á elevada por mais tempo até que a sua concentração plasmática na mãe seja inferior à fetal, ocorrendo a difusão de ETOH no sentido inverso (circulação fetal → circulação materna) (MELLO et al., 2001; BURD et al., 2007). Porém, o ETOH tem como efeito primário uma vasoconstrição no cordão umbilical e na placenta, o que pode aumentar a duração de exposição fetal ao ETOH devido à redução do fluxo sanguíneo (GRINFELD, 2005).

Após a 24^a semana de gravidez, o feto ingere o líquido amniótico, absorve o ETOH que vai para a circulação fetal, e o transfere para a circulação materna, o que parece ser um mecanismo de eliminação do ETOH contido no líquido amniótico. No entanto, pode haver um lapso de 3 horas nesse processo, mesmo após a ingestão de apenas uma dose de bebida alcoólica. É provável que o líquido amniótico da gestante alcoolista se transforme em um reservatório de ETOH, pois o nível de ETOH permanece elevado por mais tempo no líquido amniótico que no sangue materno (BURD et al., 2007; BURD, 2008).

Os danos pré-natais na época da concepção e nas primeiras semanas de gestação podem ser de natureza citotóxica ou mutagênica, levando a aberrações cromossômicas graves. No 1^o trimestre, ocorre risco de malformações e dimorfismo facial, pois se trata de fase crítica para a organogênese; no 2^o trimestre, há aumento da incidência de abortos espontâneos; e no 3^o trimestre, o ETOH lesa outros tecidos do sistema nervoso, como o cerebelo, o hipocampo e o córtex pré-frontal, além de causar retardo do crescimento intrauterino e comprometer o parto, aumentando o risco de infecções, descolamento prematuro de placenta, hipertonia uterina, trabalho de parto prematuro e presença de mecônio no líquido amniótico, o que constitui forte indicação de sofrimento fetal (GRINFELD, 2005; HOYME et al., 2005).

O cérebro é o órgão mais vulnerável ao efeito teratogênico do ETOH, o que pode acarretar em danos e malformações permanentes (MOMINO; SANSEVERINO; SCHULER-FACCINI, 2008). Tal fato, provavelmente seja decorrente da sua alta dependência de um fluxo sanguíneo ininterrupto, ao alto conteúdo de ácidos graxos livres poli-insaturados, e o relativamente baixo nível de enzimas e antioxidantes bloqueadores de radicais livres (ABEL; HANNIGAN, 1995).

A circulação placentária e a circulação cerebral fetal são meios de transporte fundamentais para o fornecimento de substâncias essenciais ao desenvolvimento e manutenção do SNC (SHIBLEY; MCINTYRE; PENNINGTON, 1999). Através dessas vias, fatores de crescimento têm acesso ao tecido cerebral em formação, induzindo a hiperplasia e a diferenciação de células neuronais e gliais (PHILLIPS et al., 1997). Alterações ou retardo no desenvolvimento dos vasos sanguíneos ou da barreira hematoencefálica fetal, formada pelo endotélio vascular e a bainha perivascular astrocitária, podem alterar o aporte de fatores de crescimento e conseqüentemente o processo de proliferação e diferenciação das células cerebrais. Os mecanismos lesivos dos vasos sanguíneos são dependentes do tempo de exposição, da concentração sanguínea, e da sensibilidade variada das diversas regiões cerebrais ao ETOH pré e pós-natal precoce (KELLY et al., 1990; MAYHAN; DIDION, 1996).

Os efeitos psicológicos encontrados em crianças expostas ao consumo, mesmo que moderado, de ETOH materno, estão listados na Fig.1, sendo os mais frequentemente relatados: déficits na cognição, habilidade matemática, fluência verbal e memória espacial (WILLFORD et al., 2004; FLAK et al., 2014).

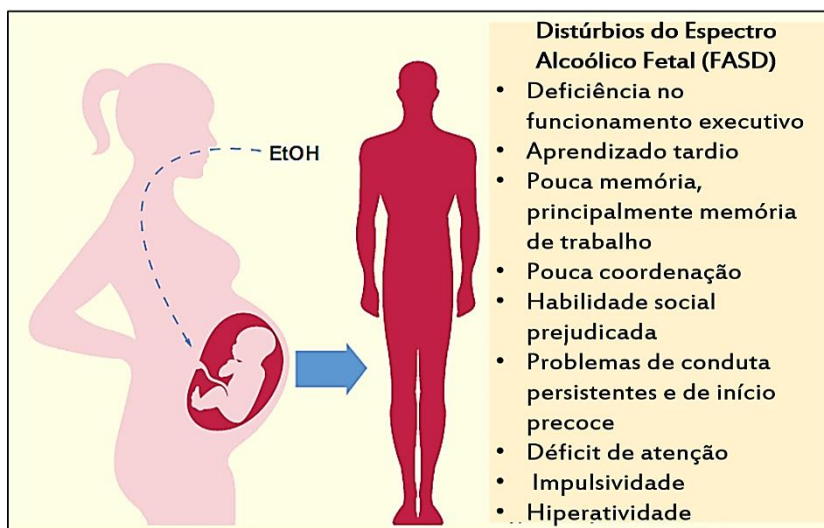


Figura 1. Sintomas psicológicos encontrados em crianças expostas ao consumo moderado de álcool materno. **Fonte:** Adaptado de COMASCO et al., 2017.

O diagnóstico da FASD pode ser corroborado por meio de imagens cerebrais, mais especificamente na análise dos núcleos da base, do cerebelo, do corpo caloso e do hipocampo, que são regiões mais comprometidas pela ação do ETOH no desenvolvimento embrionário (NICCOLS, 2007).

Um indivíduo com Desordens de Neurodesenvolvimento Relacionadas ao Álcool (*Alcohol-related Neurodevelopmental Disorders-ARND*), pode ter um comportamento desordenado e desenvolvimento cognitivo semelhante a um indivíduo com SAF, mas não apresentar a dismorfologia facial necessária para um diagnóstico de SAF conforme ilustrado na Fig. 2, (HOYME et al., 2005; 2016).

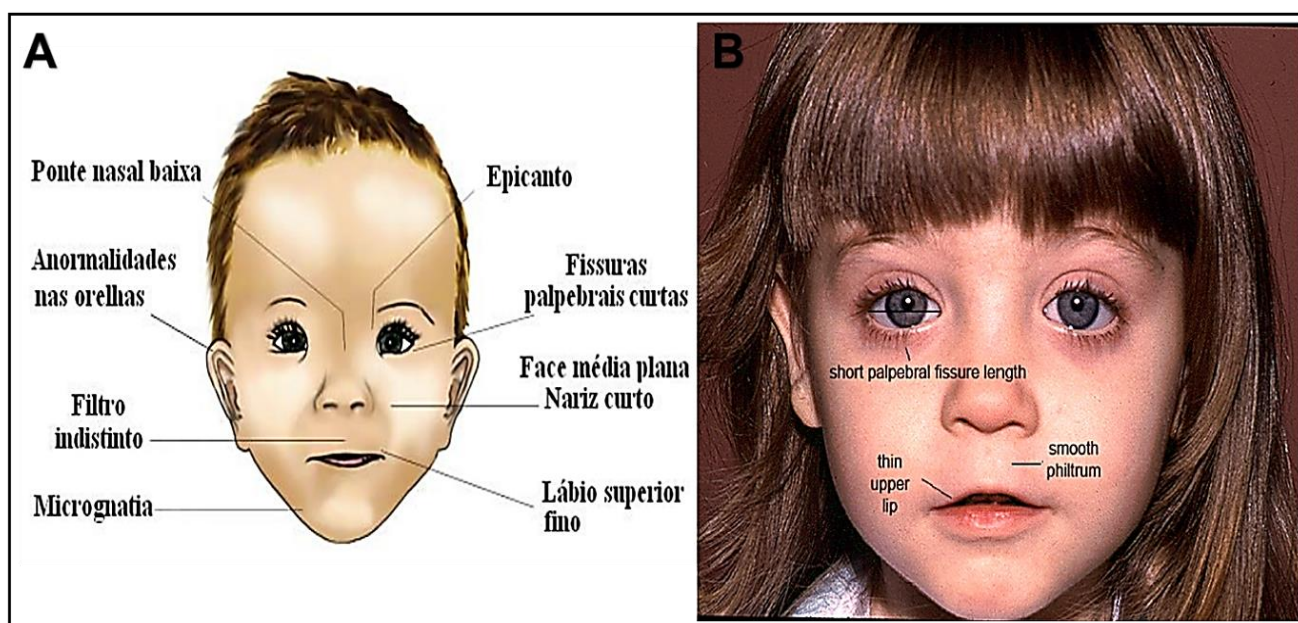


Figura 2. (A) Conjunto das principais características faciais encontradas em crianças expostas ao ETOH fetal; (B) Criança com os 3 aspectos faciais diagnósticos da SAF: comprimento de fissuras palpebrais curto, filtro liso e lábio superior fino. **Fonte:** Adaptado de PINHIRO; OLIVEIRA FILHO, 2015; WILLIAMS; SMITH, 2015.

É de fundamental importância chamar atenção para o fato de que mulheres alcoolistas que continuam com o consumo pesado de ETOH, em gestações subsequentes terão seus filhos mais novos com quadros mais graves que os anteriores (BURD, 2008), e que os danos provocados em fetos de mulheres usuárias de ETOH são permanentes e irreversíveis (GRIFELD, 2005).

2.3 Alcoolismo e lactação

O consumo de bebidas alcoólicas por lactantes vem despertando a atenção dos pesquisadores (BURGOS; BION; CAMPOS, 2004). Estudos nesse sentido são extremamente

importantes, pois apesar de os efeitos nocivos do ETOH durante a gravidez estar de certa forma bem estabelecidos e levarem a recomendações muito restritivas para as mulheres grávidas quanto à ingestão desta substância, o mesmo não ocorre em relação à lactação, embora existam lactantes que consomem bebidas alcólicas durante este período (MENNELLA, 2001a; 2001b).

Apesar da falta de comprovação científica para sustentar a afirmação de que o ETOH é um galactógeno, durante séculos as mulheres em lactação foram aconselhadas a consumi-lo como ajuda à lactação (MENNELLA; PEPINO; TEFF, 2005). Esta ideia foi transmitida em alguns casos até mesmo por profissionais de saúde, que afirmam que a ingestão de pequenas quantidades de ETOH aumenta a produção de leite nas glândulas mamárias (KACHANI et al., 2008). No entanto, estudos evidenciam que o consumo moderado de ETOH desregula a liberação de prolactina e a ocitocina (MENNELLA; PEPINO; TEFF, 2005; MENNELLA; PEPINO, 2008), responsáveis respectivamente pela indução da secreção e pela ejeção do leite. Logo após a exposição ao ETOH, o nível da prolactina aumenta enquanto a ocitocina diminui, tanto durante quanto depois da estimulação da mama materna. Apesar de o consumo de ETOH aumentar os níveis de prolactina, não são observadas relações entre níveis de prolactina e aumento na quantidade de leite, assim como, a diminuição da ocitocina foi significativamente relacionada às diminuições na produção de leite e na ejeção deste (MENNELLA; PEPINO; TEFF, 2005; MENNELLA; PEPINO, 2008).

O fator determinante da quantidade de ETOH no leite é sua concentração no sangue materno, e este fato, associado ao seu baixo peso molecular, permite que ele atinja facilmente o leite materno, atravessando o capilar endotelial materno e a célula alveolar da glândula mamária por difusão passiva, através de mecanismos que envolvem membranas biológicas formadas por fosfolipídios e proteínas, e assim a composição da membrana exerce influência na velocidade da passagem e na concentração do ETOH no leite humano (CHAVES; LAMOUNIER, 2004; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

Uma vez na circulação sanguínea, o ETOH difunde-se facilmente por todo o organismo em função do conteúdo hídrico dos diferentes órgãos e tecidos. Assim, facilmente se encontra na saliva, sangue, líquido cefalorraquidiano, suor, urina, líquido amniótico da mulher grávida e no leite da mulher a amamentar, atingindo especialmente os órgãos mais vascularizados como o fígado, cérebro, rins e músculos (MELLO et al., 2011), passando para o leite em proporções consideráveis, alterando a produção, volume, composição e excreção láctea,

provocando efeitos deletérios nos recém-nascidos (MENELLA; BEAUCHAMP, 1993; SUBRAMANIAM et al., 1995; MINANA et al., 2000).

Durante os primeiros dias de lactação, quando é produzido o colostro, as células alveolares são pequenas e o espaço intracelular é largo, o que faz com que o ETOH se transfira mais facilmente para o leite materno. Porém, como o volume de colostro ingerido pelo bebê é pequeno, a dose absoluta de ETOH também é baixa. Já com a redução dos níveis de progesterona, há crescimento das células alveolares e estreitamento dos espaços intracelulares com redução da transferência do ETOH, porém, a quantidade ingerida pelo bebê é maior (CHAVES; LAMOUNIER, 2004; HALE, 2004).

Sabe-se que nas primeiras semanas de vida dos bebês, sua capacidade de metabolizar o ETOH é metade da capacidade dos adultos. Assim, quanto mais imaturo ele for, menor sua capacidade de metabolização e eliminação do ETOH. Esses efeitos podem ser ainda mais severos em bebês pré-termo, cuja imaturidade pode prolongar a meia vida do ETOH, causando acúmulo de doses repetidas (KOREN, 2002; CHAVES; LAMOUNIER, 2004; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010). Apesar de o ETOH provocar uma redução na produção sem alteração na qualidade do leite, esta substância pode causar efeitos adversos no sono da criança, no desenvolvimento neuromotor e mais tarde, no aprendizado (NICCOLS, 2007; BURD, 2008). Ao contrário da sabedoria popular, crianças expostas ao ETOH durante as mamadas têm uma redução do tempo de sono REM (rapid eye movement), o que faz com que durmam por períodos mais curtos de tempo após o aleitamento (MENNELLA; GERRISH, 1998).

Estudos sobre ingestão de ETOH e peso cerebral relacionado à gestação – lactação e/ou lactação são escassos e as conclusões divergentes; enquanto na gestação – lactação é inibida a proliferação da matriz celular e de alguns tipos específicos de células (SVANIDZE; DIDIMOVA; TSAISHVILI, 2001), na lactação, a ingestão de baixas doses de ETOH pode provocar efeitos deletérios no SNC, seguido de uma redução na expressão de neurotrofina. De um modo geral, a administração crônica de ETOH neste período, poderá influenciar na plasticidade do SNC durante o desenvolvimento (SVANIDZE; DIDIMOVA; TSAISHVILI, 2001). A geração, migração e diferenciação neuronal ocorrem principalmente durante o período pré-natal, mas em algumas áreas do sistema nervoso este fenômeno ocorre no período pós-natal (RAKIC; 1990; LOIS; ALVAREZ-BUYLLA, 1994), como por exemplo, no cerebelo (FUJITA, 1966), hipocampo (BAYER, 1982) e na zona sub-ventricular (ALTMAN, 1969).

Em um estudo realizado em 1998, Vanglenova e Petkov alertaram a comunidade científica para os efeitos do ETOH na gestação e lactação, com prejuízo na área do aprendizado, memória (no período de adolescência) e aumento da mortalidade.

Posteriormente, demonstrou-se que a exposição alcoólica nestes períodos de desenvolvimento cerebral altera a expressão das moléculas adesivas das células neurais, sugerindo a possibilidade de serem afetadas as interações neuronal/glial. Dietas contendo 20% de ETOH alteram as células piramidais, podendo modificar a excitabilidade elétrica devido aos efeitos tóxicos, contribuindo para os defeitos cerebrais (MINANA et al., 2000; TARELO-ACUNA et al., 2000). A composição lipídica das células do sistema nervoso central de lactentes sofre a ação do ETOH, com aumento de galactolipídios no cérebro e medula, lipídios da mielina (maior concentração de fosfolipídios), aumento na incorporação de glicose nas membranas celulares, sugerindo uma maior produção lipídica. Na circulação cerebral observa-se maior teor de colesterol, fosfolipídios, esfingomielina, fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina (LALITHA et al., 1988).

Os níveis máximos de ETOH, tanto no sangue da mãe quanto no leite, ocorrem aproximadamente entre meia hora à uma hora depois da ingestão de bebidas alcoólicas e diminui a partir de então, embora haja diferenças consideráveis individuais no momento dos níveis máximos e nas taxas de eliminação de ETOH no leite e sangue (MENNELLA; BEAUCHAMP, 1991). Assim, recomenda-se que a mãe que ingeriu bebida alcoólica se abstenha de amamentar nas horas seguintes à ingestão (NICCOLS, 2007; BURD, 2008).

Na exposição ao ETOH, via leite materno, as adaptações metabólicas que ocorrem nas crias não são suficientes para assegurar o desenvolvimento normal do cérebro (TAVARES-DO-CARMO et al., 1999), ou seja, é recomendável que a gestante evite o consumo de bebidas alcoólicas, não só ao longo da gestação como também durante todo o período de amamentação (BUCHER, 2015).

2.4 Consumo de ETOH durante o desenvolvimento do SNC

A exposição pré-natal ao ETOH durante a ontogenia cerebral afeta todos os estágios de desenvolvimento, desde neurogênese, gliogênese e mielinização até mecanismos que incluem interações de célula-célula interrompidas, alteração de expressão gênica, estresse oxidativo e rupturas de sinalização do fator de crescimento, causando importantes alterações neurobiológicas, degenerativas e adaptativas, tanto no organismo em desenvolvimento quanto

no indivíduo adulto, seja ele utilizado de forma aguda ou crônica (FADA; ROSSETTI, 1998; GOODLETT; HORN; ZHOU, 2005; GUERRY; BAZINET; RILEY, 2009; FLAK et al., 2014).

O cérebro não é um órgão homogêneo, e sendo assim, suas regiões apresentam diferenças em seus ritmos de crescimento (GUEDES, 1985). Cada região cerebral, com suas coleções distintas de unidades histológicas, segue uma sequência de desenvolvimento temporal precisa e planejada intrinsecamente, e mesmo dentro de uma região em particular, variando temporalmente de uma espécie para a outra (GUEDES, 1985).

Dessa forma, o crescimento e a organização estrutural do cérebro obedecem a um cronograma pré-determinado e inflexível, sendo variavelmente vulnerável às agressões durante todo o período de desenvolvimento pré-natal e pós-natal precoce, de tal maneira que o estágio do período de desenvolvimento em que ocorre uma agressão, parece ser o fator mais decisivo na determinação do defeito final apresentado pelo cérebro do que propriamente o tipo de agressão. Assim, um mesmo insulto atuando em momentos variados determina diferentes alterações na morfologia cerebral. Em qualquer caso, os estágios posteriores de desenvolvimento que dependem dos eventos primários são afetados secundariamente (GUEDES, 1985; MORGANE et al., 1993; 2002).

A aquisição adequada da posição do neurônio, alcançada através do processo de migração ativa, afeta a morfologia, a conectividade e a função sináptica de uma célula. Embora várias classes de neurônios possam usar diferentes pistas moleculares para orientar sua migração para estruturas distantes, uma interação mediada por superfície entre células vizinhas é considerada essencial para todos os tipos de migração. A perturbação desta interação célula-célula pode ser importante em várias anormalidades cerebrais congênicas e / ou adquiridas (RAKIC, 1990).

A maioria dos neurônios em desenvolvimento do sistema nervoso de vertebrados é gerado em locais que são significativamente diferentes da sua localização no cérebro adulto (MILLER, 1993). Os vários grupos de neuroblastos migram em diferentes estágios, alguns antes de outros, subsequente ao alongamento axonal, seguindo precursores com função específica que estabelecem o futuro da identificação neuronal, suas propriedades funcionais, e futuras conexões, a fim de definir as distintas camadas no neocórtex adulto. Assim, o desenvolvimento do SNC envolve uma série de eventos de programação celular e molecular (MARIN-PADILLA, 1992; FERREIRA, 2004).

Os mecanismos moleculares da neuroteratogênese induzida pelo ETOH são complexos e diferentes. Estudos demonstraram que o ETOH interrompe a formação do SNC em desenvolvimento, interferindo em vários eventos moleculares, bioquímicos e celulares necessários para o desenvolvimento neurológico (GUERRI; BAZINET; RILEY, 2009; ALFONSO-LOECHES; GUERRY, 2011; MOST et al., 2014). A diversidade dos mecanismos e dos sítios de atuação do ETOH é decorrente da presença do grupo hidroxila, que o torna solúvel e permite a formação de pontes de hidrogênio com aceptores ou doadores de elétrons de proteínas ou fosfolipídios de membranas celulares, ou com a água da matriz extracelular (YURITTAS et al., 1992; BARRY et al., 1994). O ETOH atua sobre sítios celulares, de maneira reversível ou não, provocando modificações conformacionais em enzimas, proteínas e fosfolipídios estruturais e genes (DICKINSON et al., 1993; DIAMOND; GORDON, 1997).

Em curto prazo surgem alterações degenerativas celulares cerebrais decorrentes de perturbações na transdução de sinais, na permeabilidade de canais iônicos, no transporte de proteínas (FREUND, 1973; GOODLETT; LILLER; HOFFMAN, 1996), inibição da fosforilação de proteínas associadas a microtúbulos e endocitose de fatores neurotróficos (ROSENBERG, 1996), e na morte celular direta por hiper ou hipo-regulação de receptores (excitotoxicidade) ou apoptose (MICHAELIS et al., 1990; GOODLETT; LILLER; HOFFMAN, 1996; AMARANTE-MENDES et al., 1999; IKONOMIDOU et al., 2001). Posteriormente, aparecem as alterações morfofuncionais, decorrentes das modificações na expressão genética, que afetam o desenvolvimento pós-natal, bem como a capacidade psicológica, comportamental e cognitiva (GUERRI, 1998; BOOKSTEIN et al., 2002; NIXON; CREWS, 2002).

Os efeitos deletérios do ETOH sobre o encéfalo humano em desenvolvimento ainda são mal compreendidos, mas sabe-se que o efeito mais prejudicial é a indução da neuroapoptose, que está associada com o bloqueio de N-metil-D-aspartato (NMDA), que normalmente é ativado pelo neurotransmissor glutamato, e também a estimulação excessiva de receptores ácido gama-aminobutírico (GABA) (IKONOMIDOU et al., 2000). O receptor NMDA tem um papel importante na plasticidade neuronal durante o desenvolvimento e na aprendizagem. Porém, quando ele se torna hiperativo, pode levar a célula a um processo de excitotoxicidade, onde há um aumento no cálcio intracelular que leva a célula a morte (IDRUS; THOMAS, 2011). O ETOH atua bloqueando os receptores de NMDA, e o corpo, como resposta ao bloqueio, aumenta a atividade desses receptores para compensar. No entanto, quando o ETOH

é eliminado, essa compensação pode resultar em uma hiperativação e uma consequente excitotoxicidade (WARREN; HEWITT; THOMAS, 2011). Um modelo hipotético para as principais modificações a nível de neurotransmissão, bem como de seus componentes, observadas em modelos alcoólicos durante o desenvolvimento do SNC é apresentado na Fig.3.

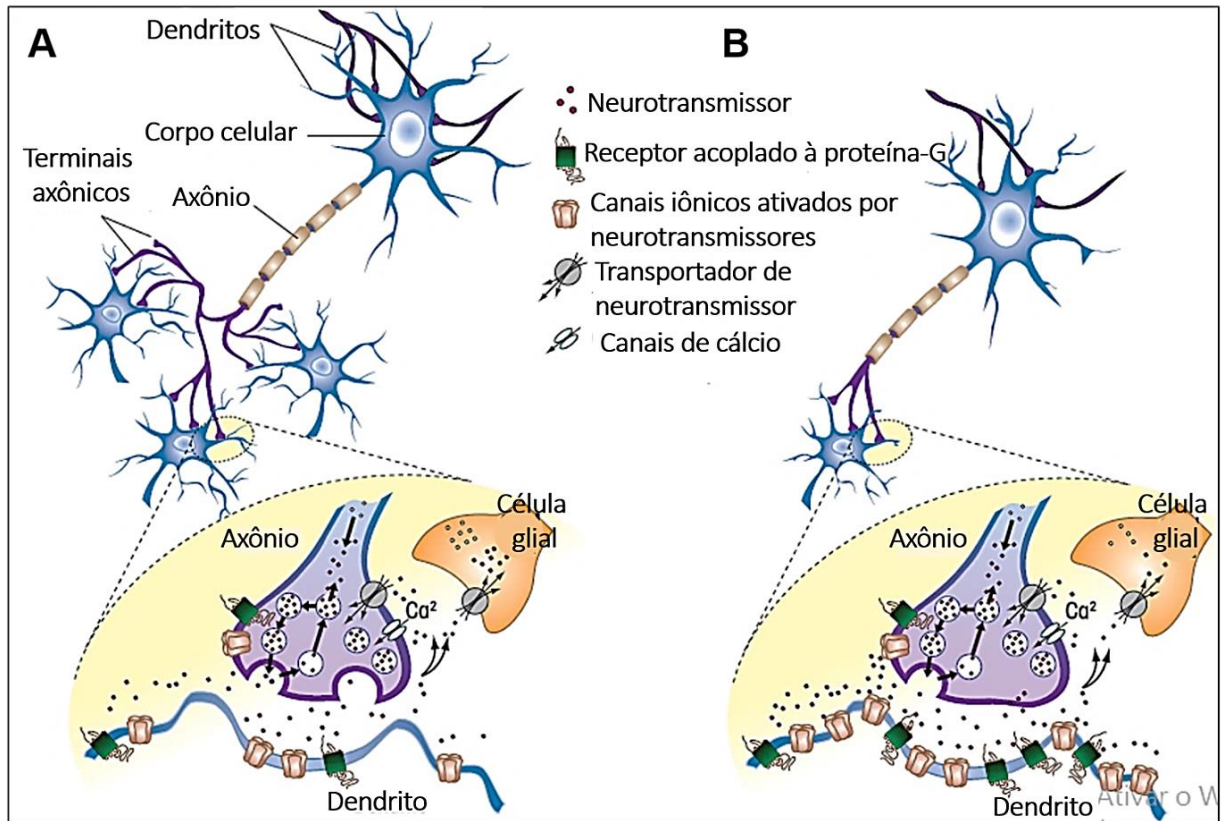


Figura 3. Potenciais locais de ação da exposição ao etanol no desenvolvimento de sistemas de neurotransmissores. **A)** O painel superior é uma representação esquemática dos componentes de um neurônio. Note que os axônios fazem conexões sinápticas com os dendritos de três neurônios adjacentes. No painel inferior é apresentada uma sinapse, onde nos terminais axonais, os neurotransmissores são sintetizados e empacotados em vesículas sinápticas. A liberação do neurotransmissor é desencadeada pelo influxo de Ca^{2+} via canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem. A liberação de neurotransmissores pode ser modulada por canais iônicos neurotransmissores e receptores acoplados à proteína G expressos em terminais axonais. Os neurotransmissores atuam ativando canais iônicos neurotransmissores e receptores acoplados à proteína G expressos em neurônios-alvo (em locais pós-sinápticos ou extra-sinápticos). Um mecanismo pelo qual a ação do neurotransmissor pode ser terminada é por recaptação no terminal axonal ou células gliais vizinhas através de transportadores de neurotransmissores. **B)** Painel superior: a exposição ao etanol no desenvolvimento poderia afetar um dado sistema de neurotransmissores, diminuindo o número de neurônios, comprimento e / ou número de dendritos e axônios, e / ou modificando o número e / ou a eficácia das sinapses. Painel inferior: a exposição ao etanol no desenvolvimento pode afetar qualquer um dos componentes envolvidos na neurotransmissão. Neste exemplo hipotético, a exposição ao etanol diminuiu a liberação de neurotransmissores, e isso levou a um aumento compensatório nos níveis de receptores de neurotransmissores pós-sinápticos e extra-sinápticos no neurônio-alvo. **Fonte:** Adaptado de VALENZUELA, PUGLIA, ZUCCA, 2011.

O intercâmbio de informações entre axônios e dendritos determina se as sinapses são mantidas ou eliminadas e os neurotransmissores químicos desempenham papéis importantes em cada uma dessas etapas de desenvolvimento neuronal. Mesmo antes das sinapses serem

formadas, GABA e glutamato regulam a proliferação, migração e diferenciação de células progenitoras (MANENT; REPRESA, 2007). Em neurônios imaturos, glutamato e GABA contribuem para a maturação de dendritos e axônios e também estão diretamente envolvidos na geração e aperfeiçoamento de contatos sinápticos (CLINE; HAAS, 2008).

2.5 Sistema serotoninérgico

O sistema serotoninérgico tem uma distribuição generalizada no SNC (Fig. 4), e influencia quase todas as esferas da fisiologia dos mamíferos (NEBIGIL et al., 2000), assim como funções mais controladas centralmente, cognição, aprendizado e memória (MONSHEEL; SANDERS-BUSH, 2004).

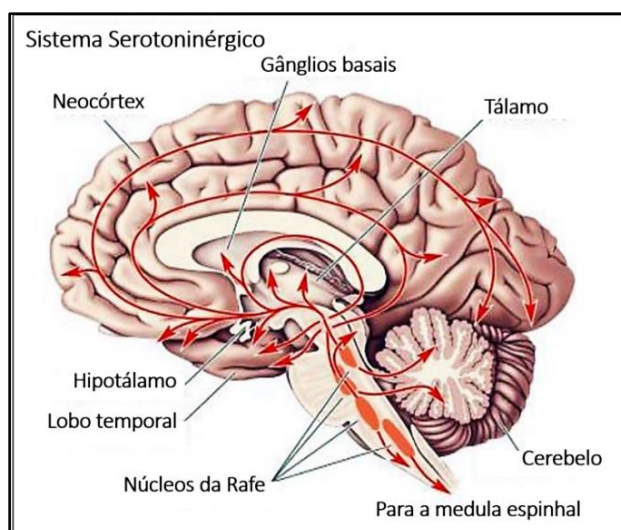


Figura 4. Sistema modulatório serotoninérgico de projeção difusa, originário dos núcleos da rafe.

Fonte: www.coscienza-universale.com/salute/salute-seratonina-importanza-alimenti-che-aiutano-produrla/.

A amina biogênica 5-HT é o neurotransmissor responsável pela caracterização e desempenho de diversas ações, como a regulação de importantes vias metabólicas dentro e fora deste sistema. Esta substância foi reconhecida inicialmente em 1948, como uma substância vasoconstritora encontrada no soro sanguíneo, passando então a ser chamada de “serotonina”, sendo “serum” soro e “tonic” tônus (RAPPTOR et al., 1948). Sua estrutura molecular foi desvendada em meados do século XX e em seguida a 5-HT foi identificada em vários tecidos, inclusive no sistema nervoso central de vertebrados e invertebrados, e em 1957 passou a ser reconhecida como neurotransmissor, além de terem sido encontrados múltiplos subtipos de receptores 5-HT no cérebro (TWAROGE; PAGE, 1953; BOGDANSKY et al., 1956; BRODIE; SHORE, 1957; GADDUM; PICARELLI, 1957).

A síntese de 5-HT depende inicialmente da ingestão de alimentos ricos em triptofano e da sua passagem através da barreira hematoencefálica. Para tal, é necessário que ocorra também a elevação dos níveis de insulina na circulação sanguínea, uma vez que este hormônio atua diminuindo a concentração de outros aminoácidos que iriam concorrer com o triptofano pela passagem através da barreira hematoencefálica, tornando-o disponível no tecido nervoso onde pode então ser convertido em 5-HT nos neurônios dos núcleos da rafe (MEYERS, 2000).

Neste processo, a 5-HT é sintetizada a partir da hidroxilação e descarboxilação do aminoácido essencial triptofano, conforme ilustrado na fig. 5. Logo, a síntese de serotonina é limitada pela disponibilidade de triptofano no fluido extracelular que banha os neurônios, o que conseqüentemente também limita a atividade da enzima *triptofano hidroxilase*. A fonte do triptofano encefálico é o sangue, e a fonte do triptofano circulante é a dieta (grãos, carne e laticínios). Conseqüentemente, a deficiência de triptofano na dieta pode rapidamente levar a uma depleção de serotonina no encéfalo (BEAR; CONNORS; PARADISO; 2008; FEIJÓ et al., 2011).

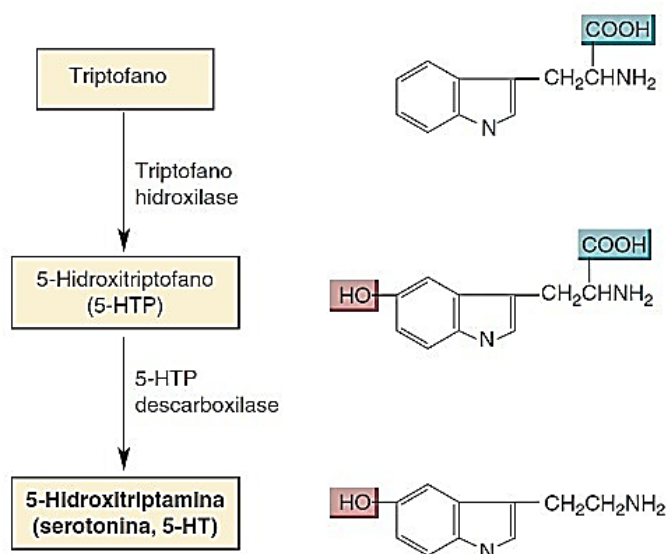


Figura 5. Síntese de serotonina (5-HT) a partir do aminoácido triptofano. Este processo ocorre em duas etapas: o triptofano é convertido inicialmente em um intermediário denominado 5-HTP (5-hidroxitriptofano) pela enzima *triptofano hidroxilase*, e em seguida o 5-HTP é então convertido em 5-HT pela enzima *5-HTP descarboxilase*. Fonte: BEAR, CONNORS; PARADISO, 2002.

Após ser sintetizada, a 5-HT é armazenada em vesículas sinápticas nos terminais pré-sinápticos, até serem liberadas por exocitose sob o controle do cálcio; isto ocorre quando o terminal axonal do neurônio é excitado e o cálcio entra no terminal, fazendo com que as

vesículas se incorporem a membrana do axônio liberando a 5-HT na fenda sináptica. A recaptação da 5-HT da fenda sináptica ocorre através da ação do transportador de 5-HT (5-HTT), que controla e finaliza os efeitos pós-sinápticos da serotonina. Uma vez de volta ao citosol do terminal axonal serotoninérgico, a 5-HT é transportada para a vesícula sináptica ou é degradada através da ação catabólica da enzima monoaminoxidase A (MAO A), de cuja ação resulta o ácido 5-hidroxi-indolacético (5-AHIA). Posteriormente, o 5-AHIA sofre a ação da enzima triptofano aldeído-desidrogenase, resultando em ácido 5-hidroxi-indólico (5-HIAA), produto final do catabolismo da 5-HT (GUYTON, HALL, 2006; HALBACH; DERMIETZEL, 2006a; BEAR; CONNORS; PARADISO, 2008).

Em estágios iniciais de desenvolvimento cerebral de ratos, são encontrados dois grupos de neurônios que expressam 5-HT no rombencéfalo ventral: grupo rostral e grupo caudal (Fig. 6). Em geral, essas células se formam na placa basal; uma exceção são as células serotoninérgicas que contribuem para os núcleos dorsais da rafe. Acredita-se que as células rostrais originem o rafe dorsal (B7), o rafe médio (núcleo central superior, B8), o rafe linear dorsal caudal (B6), e o grupo celular ventrolateral (B9). As células caudais contribuem para os núcleos magno, obscuro e Pálido (B1-B3) (RUBENSTEIN, 1998). Os corpos celulares 5-HT dos neurônios da rafe em desenvolvimento podem ser detectados já no dia gestacional 12 ou 13 (G12-G13), (AITIKIN; TORK, 1988), e o tempo de pico de diferenciação desses neurônios corresponde a G15-G16 (LAUDER, 1995).

Durante o final da gestação, o sistema 5-HT sofre um desenvolvimento rápido e, por volta de G19, a distribuição geral de neurônios 5-HT se assemelha à do adulto. Os contatos sinápticos são detectados pelo G20 (LAUDER, 1975). O desenvolvimento do sistema 5-HT continua durante o período pós-natal precoce; as concentrações de locais de recaptação de 5-HT, e receptores de 5-HT_{1A} atingem níveis quase adultos até a idade de três semanas de idade (DRUSE, 1992).

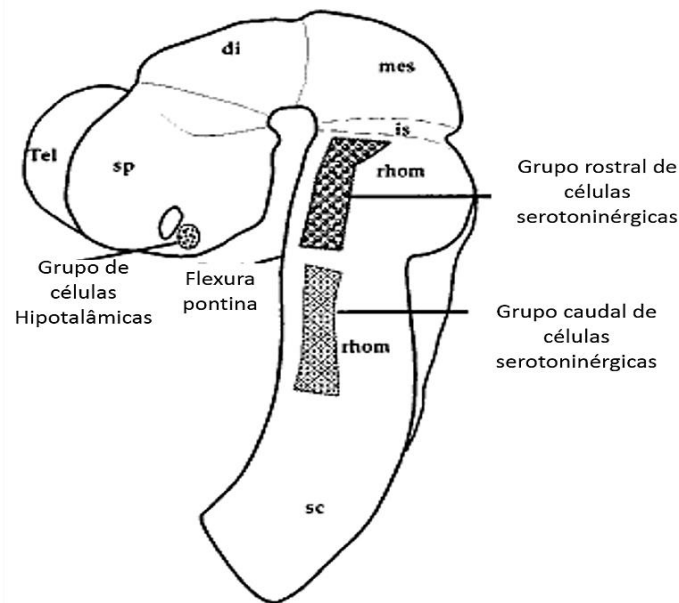


Figura 6. Esquema que mostra uma visão lateral de um embrião de mamífero de meia gestação no estágio inicial do tubo neural (rato E10), evidenciando a localização aproximada dos núcleos serotoninérgicos. Abreviaturas: di (diencéfalo), is (istmo), mes (mesencefalo), rhom (rombomeres), sc (medula espinhal), sp (prosencefalo secundário), Tel (telencéfalo). **Fonte:** Adaptado de RUBSTEINN, 1998.

Em seres humanos, os neurônios serotoninérgicos podem ser detectados quando o embrião tem apenas cinco semanas de idade (SUNDSTROM et al., 1993), com crescimento e multiplicação rápidos até a 10ª semana de gestação (LEVALLOIS et al., 1997). Após 15 semanas, observa-se o agrupamento dos corpos celulares de 5-HT nos núcleos da rafe. A densidade sináptica dos sistemas da amina biogênica no córtex cerebral humano duplica desde o nascimento até um ano de idade, quando atinge um valor máximo e diminui a partir de então até atingir os níveis de 10 anos de idade (HUTTENLOCHER; DABHOLKAR, 1997). Da mesma forma, ocorre aumento nos níveis de 5-HT durante os primeiros dois anos após o nascimento e em seguida, após os cinco anos de idade diminuem (HEDNER et al., 1986).

Além de desempenhar um importante papel na fisiologia dos mamíferos, a 5-HT atua como fator de crescimento durante a embriogênese, através da sua interação com o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), S100 β , dentre outros mensageiros químicos (WHITAKER-AZMITIA, 2001); tem capacidade de alterar a morfologia de muitos tipos de células de mamíferos, incluindo o músculo esquelético (O'STEEN et al., 1967), plaquetas (LEVEN et al., 1983) e fibroblastos (BOSWELL et al., 1992), e manutenção da plasticidade neuronal, mantendo as conexões sinápticas no córtex e no hipocampo (AZMITIA et al., 1996).

É importante salientar que, há substâncias que alteram os níveis de serotonina, sendo fortemente contraindicadas em mulheres grávidas, pois prejudicam o desenvolvimento do

cérebro após exposição pré-natal, como cocaína (WHITAKER-AZMITIA, 1998), álcool (SARI; ZHOU, 2004) e nicotina (MUNEOKA et al., 1997).

2.6 Núcleos serotoninérgicos da rafe e suas projeções

Os núcleos da rafe projetam-se a diferentes regiões do encéfalo (Fig. 7); aqueles mais rostrais, na ponte e no mesencéfalo, inervam a maior parte do encéfalo, projetam amplamente a todo o prosencéfalo e ao cerebelo de forma difusa. Estes núcleos participam da regulação do ciclo vigília-sono, e participam também da modulação de comportamentos motivacionais e emocionais, onde os núcleos da rafe pontina continuam-se sem interrupção com a grisea periaquedutal do mesencéfalo, uma estrutura com importante participação nos comportamentos emocionais (TORK, 1985; JACOBS; AZMITIA, 1992; BEAR; CONNORS; PARADISO, 2002). Os mais caudais, no bulbo, têm projeções descendentes que inervam a medula espinhal, onde modulam sinais sensoriais do controle simpático e da modulação endógena da dor (TORK, 1985; JACOBS; AZMITIA, 1992; BEAR; CONNORS; PARADISO, 2002).

O conhecimento sobre a existência e localização dos núcleos da rafe data de estudos realizados inicialmente por Ramón y Cajal (1911), o qual descreveu estas células como grandes neurônios multipolares de projeções indefinidas, formando agregados na linha média do tronco encefálico. Em 1960, com base em um estudo citoarquitetônico realizado em gatos (TABER; BRODAL; WALBERG, 1960), foi realizada uma das primeiras descrições destes núcleos, onde foram descritos um conjunto de oito núcleos localizados na linha média, do mesencéfalo à transição bulbo-espinhal, sendo então denominados do sentido rostrocaudal: núcleos lineares rostral e caudal da rafe, dorsal da rafe, mediano da rafe ou central superior, pontino da rafe, magno da rafe, pálido da rafe, e obscuro da rafe (TABER; BRODAL; WALBERG, 1960). Posteriormente, em 1964, o surgimento da descrição de um sistema de neurônios monoaminérgicos no tronco encefálico de ratos, evidenciados pela técnica de fluorescência induzida por formaldeído, despertou o interesse pelo estudo da morfologia e funções dos núcleos da rafe (FALCK et al., 1962; DAHLSTROM; FUXE, 1964).

Em decorrência da sua íntima relação com a rafe, os grupamentos serotoninérgicos então evidenciados foram designados alfanumericamente como grupamentos B1 a B9 no tronco encefálico em um sentido caudo-rostral em ratos (Fig. 7), embora fosse notada uma extensa superposição entre os neurônios supostamente produtores de 5-HT, estando estes sobrepostos

e correlacionados aos núcleos da rafe (DAHLSTROM; FUXE, 1964). Ulteriormente, esta classificação foi integrada com a nomenclatura citoarquitetônica do sistema da rafe, graças à introdução da técnica de imunohistoquímica (STEINBUSH et al., 1978; STEINBUSH, 1981; TÖRK, 1985).

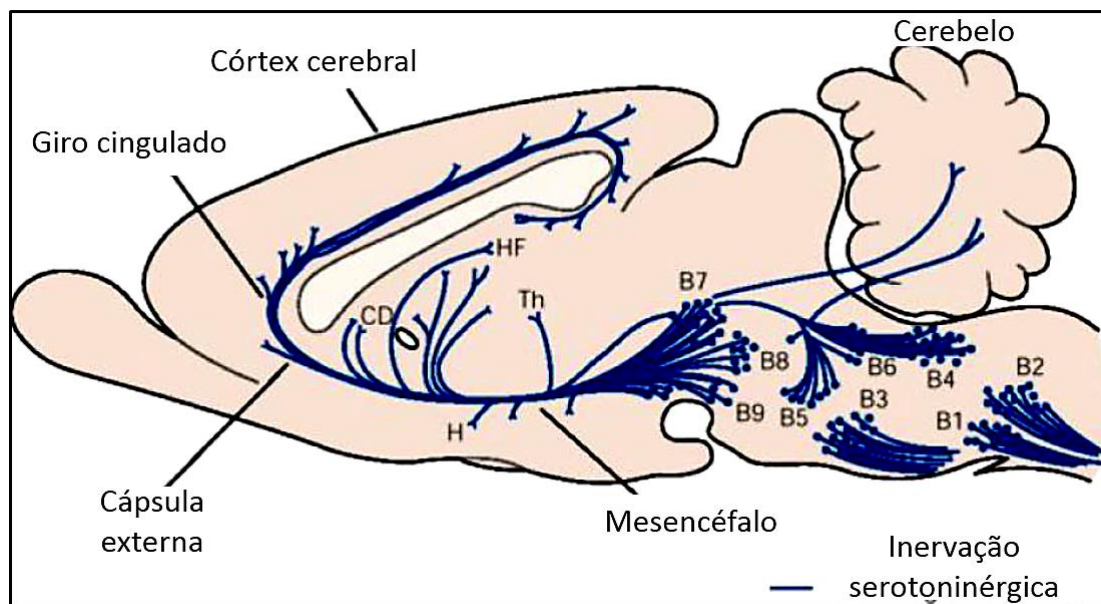


Figura 7. Grupamentos serotoninérgicos B1 a B9. **Fonte:** Adaptado de DAHLSTROM; FUXE, 1964.

A anatomia destes grupos foi revisada em muitas espécies diferentes, inclusive em rato (TORK, 1985; PAXINOS; WATSON, 2007), coelho (BJARKAM; SORENSEN; GENESER, 1997), gato (TABER; BRODAL; WALBERG, 1960; JACOBS; GANNON; AZMITIA, 1984), humanos (TORK, 1990), macacos do Novo e Velho mundo (AZMITIA; GANNON, 1983; FELTEN; SLADEK, 1983) e mocós (SOARES et al., 2012).

A sistematização de Paxinos e Watson (2007) é a classificação mais recente dos núcleos da rafe (grupamentos serotoninérgicos) no cérebro de ratos, onde são descritos 10 grupamentos nucleares da rafe no sentido rostrocaudal no tronco encefálico, estendendo-se desde o mesencéfalo ao bulbo (Fig.8). Em sequência rostrocaudal: mesencéfalo (5 núcleos), núcleo linear rostral da rafe (RLi), linear caudado da rafe (CLi), dorsal da rafe (DR), mediano da rafe (MnR) e núcleo para-mediano da rafe (PMnR). Na ponte (2 núcleos) pontino da rafe (PnR) e interpósito da rafe (RIP). Por último, no bulbo (3 núcleos), magno da rafe (RMg), pálido da rafe (RPa) e obscuro da rafe (Rob) (Paxinos; Watson, 2007).

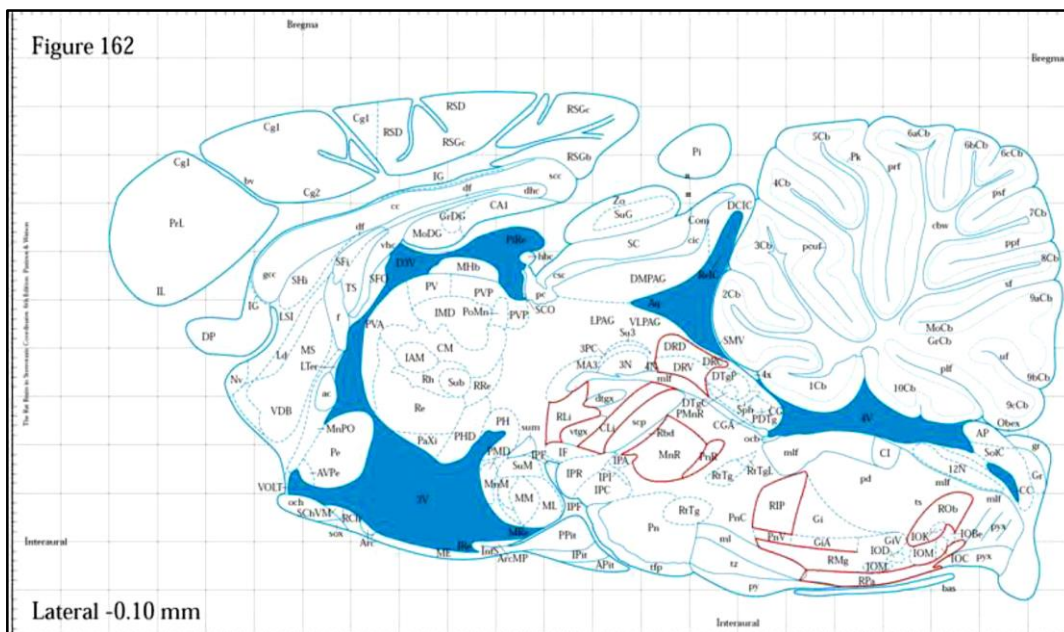


Figura 8. Núcleos da rafe. **Fonte:** Adaptado de PAXINOS; WATSON, 2007.

A análise hodológica neural dos núcleos da rafe é bastante complexa, considerando-se que estes núcleos emitem e recebem projeções de praticamente todas as regiões do sistema nervoso central, embora com densidades variáveis em determinadas áreas (TORK, 1985; 1990; JACOBS; AZMITIA, 1992). No entanto, há um padrão de organização nas projeções dos núcleos serotoninérgicos, e este foi revelado a partir de diversos estudos realizados em diferentes espécies, possibilitando estabelecer a divisão dessas eferências em três direções: projeções ascendentes, projeções para o tronco encefálico e cerebelo e projeções descendentes. As projeções ascendentes são dirigidas ao cérebro e provêm principalmente de neurônios dos núcleos serotoninérgicos rostrais, como o DR e MnR, assim como a região supralemniscal (B9) e áreas adjacentes (VERTES, 1991; JACOBS; AZMITIA, 1992; BAKER; HALLIDAY, 1995; VERTES, KOCSIS, 1994; VERTES et al., 1999; PINATO et al., 2007).

As projeções para o tronco encefálico e cerebelo provêm dos núcleos PnR e RMg da rafe, embora também participem núcleos mais rostrais e caudais (HARDING et al., 2004). No tronco encefálico, estes núcleos emitem projeções para diversas áreas como: colículo superior, área tegmentar ventral, complexo interpeduncular, substância negra, locus ceruleus e núcleo olivar inferior; e ainda núcleos de nervos cranianos tais como os núcleos motores dos nervos facial e trigêmeo, núcleos sensitivos do trato espinal do trigêmeo, núcleo do trato solitário, núcleos cocleares e núcleos vestibulares. No cerebelo o núcleo RMg é o principal responsável pelas inervações serotoninérgicas desta área, onde atingem os núcleos centrais e o córtex;

projeções serotoninérgicas provenientes deste núcleo também são encontradas na medula espinal (STEINBUSCH,1981; TORK, 1985; HALBERSTADET; BALABAM, 2003; HARDING et al., 2004; HALBERSTADET; BALABAM, 2006a.b). As conexões aferentes para o núcleo RMg provém em boa parte da formação reticular e substância cinzenta central do mesencéfalo. Adicionalmente, ele recebe projeções do grupamento B9, núcleos dorsal e mediano da rafe e densa inervação de substância P e neurotensina (JACOBS; AZMITIA, 1992; NOGUEIRA et al., 1999).

Finalmente, as projeções descendentes provém dos núcleos ROb, RPa e também do núcleo RMg, sendo responsáveis pelas inervações serotoninérgicas na medula espinal, incidindo nas colunas ventral e dorsal (STEINBUSCH, 1981; TORK, 1985). As aferências do núcleo ROb provém principalmente da formação reticular e substância cinzenta periaquedutal. No núcleo RPa, estas são oriundas das áreas pré-ópticas medial, lateral e mediana, áreas hipotalâmicas anterior, dorsal, lateral e posterior, núcleos paraventricular e periventricular do hipotálamo, zona incerta, substância cinzenta central, formação reticular do tronco encefálico, núcleo do trato espinal do trigêmeo e medula espinal (TÖRK, 1985; JACOBS; AZMITIA, 1992; NOGUEIRA et al., 1999).

2.7 Receptores serotoninérgicos e o desenvolvimento do cérebro

A 5-HT participa do desenvolvimento do cérebro fetal, atuando na regulação dos processos de desenvolvimento, incluindo diferenciação, migração celular e sinaptogênese (LAUDER, 1995), modula o alongamento dos cones de crescimento, o crescimento dos neuritos nas áreas alvo e a formação de ligações colaterais entre os neurônios 5-HT; também auto-amplifica sua própria síntese durante o desenvolvimento (WHITAKER-AZMITIA; AZMITIA,1986), e exerce uma influência epigenética e maturacional nos tecidos alvo (LAUDER; KREBS, 1978). Muitos dos efeitos tróficos da 5-HT são mediados pelas suas ações nos receptores 5-HT nos neurônios e astrócitos (WHITAKER-AZMITIA; AZMITIA, 1986; WHITAKER-AZMITIA et al., 2001). Há evidências que implicam a 5-HT na regulação da geração do circuito neocortical dentro do córtex somatossensorial. Níveis reduzidos de 5-HT retardam o início da diferenciação de neurônios que são encontrados ao longo da via onde as fibras de 5-HT crescem (LAUDER et al., 1995). Os receptores de 5-HT são expressos suficientemente cedo para mediar esses efeitos (TECOTT et al., 1995).

Os primeiros registros descritivos dos receptores de 5-HT foram realizados em 1957, quando Gaddum e Picarelli relataram a existência de múltiplos subtipos de receptores de serotonina, inicialmente chamados de 5-HT-M e 5HT-D. Com a aplicação de técnicas de clonagem molecular, foram identificadas sete classes de receptores de 5-HT em mamíferos (5-HT₁ a 5-HT₇), com 14 subtipos distintos identificados (HOYER et al.,1994). Com o uso das técnicas de autorradiografia e imunistoquímica foi possível identificar e localizar esses receptores em todo o encéfalo, bem como conhecer os genes que os codificam. Pode-se também conhecer a estrutura desses receptores, sendo estes compostos por três constituintes: o transportador, o canal iônico acoplado ao ligante e o receptor acoplado a proteína G (este último compreende o grupo mais numeroso). Das sete classes e dos 14 subtipos de receptores 5-HT identificados, os mais frequentemente relatados são: o 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1C}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{1E}, 5-HT_{1F}, 5-HT_{2A}, 5-HT₃, 5-HT₄, 5-HT₅, 5-HT₆ e 5-HT₇ (GADDUM; PICARELLI, 1957; VERGÉ; CALAS, 2000).

Estudos farmacológicos operacionais, utilizando ligantes seletivos (agonistas e antagonistas) e biologia molecular, demonstram que existem pelo menos três grupos principais ou classes de receptor 5-HT: 5-HT₁, 5-HT₂ e 5-HT₃. Cada grupo é operacional e estruturalmente distinto, cada qual possuindo seu próprio sistema de transdução. Os receptores 5-HT₁ e 5-HT₂ e seus respectivos subtipos, assim como outros receptores 5-HT₄, 5-HT₅, 5-HT₆ e 5-HT₇, são acoplados a proteínas G, enquanto que o receptor 5-HT₃ é um canal iônico (HOYER et al., 1994). As ações desencadeadas pelos receptores 5-HT são bem diversificadas, como por exemplo: o receptor 5-HT_{1A} inibe a enzima *adenilciclase* podendo estar relacionado com funções ansiolíticas e antidepressivas. 5-HT_{1B} e 5-HT_{1D} são autorreceptores e inibem a secreção da 5-HT. A família de receptores 5-HT₂ (5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} e 5-HT_{2C}, este último foi inserido vindo da família 5-HT₁) apresenta como característica estrutural sete domínios transmembrana, e a ação principal desses receptores é a ativação da *fosfolipase C*, a qual estimula o mecanismo de segundo mensageiro. O receptor 5-HT₃ é um canal iônico, sendo assim, apresenta um tempo de ação mais rápido do que os outros tipos de receptores serotoninérgicos e os receptores 5-HT₄, 5-HT₆ e 5-HT₇ quando ativados, ativam a *adenilato ciclase* na célula pós-sináptica (TECOTT et al., 1995; HOYER et al., 1994; VERGÉ; CALAS, 2000; HALBACH; DERMIETZEL, 2006b).

Estudos, inclusive autorradiográficos, realizados em estágios precoces de desenvolvimento do neocórtex, demonstraram que durante o desenvolvimento cerebral ocorrem variações na expressão de subtipos de receptores serotoninérgicos, dentre estes os

mais citados são os receptores 5-HT_{1A} e subtipos de receptores 5-HT₂ (BAR-PELED et al., 1991a; DYCK; CYNADER, 1993a).

Evidências sugerem que o receptor 5-HT_{1A} está presente no início do desenvolvimento, e que este é funcional antes do nascimento por poder ser regulado (para cima ou para baixo) no cérebro fetal, assim como está envolvido na regulação do desenvolvimento do sistema serotoninérgico, uma vez que a exposição pré-natal ao pesticida pCPA (ácido 4-clorofenoxiacético) que esgota a 5-HT no cérebro de ratos, reduziu a expressão pós-natal dos receptores 5-HT_{1A}, sugerindo que este sistema é auto regulatório (SANDERS-BUSH et al., 1972b,1974).

Investigações em várias regiões cerebrais, assim como o tronco cerebral (HILLION et al., 1993), cerebelo (DAVAL et al., 1987) e córtex visual (DYCK; CYNADER, 1993a), demonstram que o nível mais alto de expressão de mRNA de 5-HT_{1A} ocorre durante o desenvolvimento dessa região e declina após ocorrer a maturação. No cérebro fetal humano, os picos de expressão de mRNA 5-HT_{1A} aumentam entre 16 e 22 semanas (BAR-PELED et al., 1991a).

Assim como acontece com o receptor 5-HT_{1A}, a atividade dos receptores 5-HT₂ também é aumentada nos estágios críticos do desenvolvimento do cérebro. Um exemplo desta maior atividade são os níveis de fosfato de inositol mediados por 5-HT₂, que são aproximadamente 10 vezes maiores no cérebro em desenvolvimento em comparação com cérebro adulto maduro (CLAUSTRE et al., 1988). Outra semelhança com o receptor 5-HT_{1A} é que os estressores ambientais pré ou pós-natal que atuam através do sistema glutamatérgico durante o desenvolvimento, podem alterar permanentemente o número e a função dos receptores 5-HT₂ (AGHAJANIAN; MAREK, 1999).

A 5-HT modula a embriogênese de uma maneira dose-dependente pela ativação dos receptores 5-HT₂ em ratos (LAUDER, 1995, 1997; MOISEIWITSCH et al., 1998). Lauder e colegas (2000), também investigaram padrões de expressão dos receptores 5-HT₂ durante a embriogênese nesta espécie. Foram observados padrões espaciais temporais diferenciais e sobrepostos de imunoreatividade do receptor 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} e 5-HT_{2C} durante fases ativas da morfogênese em uma variedade de tecidos embrionários, incluindo neuroepiteliais do cérebro e da medula espinal, notocorda, somitos, crista neural cranial, mesênquima craniofacial e epitélio, miocárdio cardíaco e coxins endocárdiais, germes dentários, folículos de bigodes, cartilagem e músculos estriados.

A exposição de embriões de rato no estágio de dobra da cabeça para antagonistas seletivos do receptor 5-HT₂ revelou potentes efeitos no desenvolvimento. O efeito mais pronunciado foi observado após a administração de ritanserina (antagonista dos receptores de 5-HT), que tem alta afinidade para todos os receptores 5-HT₂, especialmente o subtipo de receptor 5-HT_{2B}, e produziu embriões 100% malformados. O antagonista do receptor de 5-HT_{2A/2C} mianserina foi 10 vezes menos potente, enquanto que a cetanserina, que se destina principalmente ao receptor 5-HT_{2A}, não causou um número significativo de embriões malformados em qualquer dose testada (LAMBERT; LAUDER, 1999; LAUDER; LIU; GRAYSON,2000). Estes dados demonstram que a 5-HT atua como um sinal morforregulador importante durante a embriogênese.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar os efeitos da exposição crônica do ETOH na morfologia dos núcleos Dorsal e Mediano da Rafe em camundongos procriados por mães submetidas à exposição ao ETOH durante a gestação e/ou lactação.

3.2 Objetivos específicos

- ✓ Identificar e caracterizar citoarquiteticamente, a partir da marcação de Nissl, a delimitação dos núcleos dorsal e mediano da rafe;
- ✓ Analisar, através de métodos imunohistoquímicos, a imunoreatividade dos núcleos dorsal e mediano da rafe à serotonina;
- ✓ Verificar, através da análise de densidade óptica relativa, as diferenças no padrão de imunoreatividade das células 5-HT nos diferentes grupos experimentais;
- ✓ Analisar o impacto da exposição crônica de ETOH durante a gestação, lactação e gestação+lactação, sobre a massa corporal e encefálica dos animais.

4. METODOLOGIA

4.1 Animais

Neste trabalho foram utilizados 20 exemplares de camundongos (*Mus musculus*), sendo 10 machos e 10 fêmeas jovens, criados no biotério do Departamento de Química Biológica da Universidade Regional do Cariri (URCA). Durante todo o procedimento experimental, os animais foram acomodados em caixas micro isoladoras, medindo 32 x 20 x 21 cm, contendo tampa aramada para apoiar o bebedouro e a ração, dutos para a retirada de odores e sistema de insuflamento e exaustão de ar, proporcionando baixo índice de infecções, eliminação de odores e baixo volume de ruídos, garantindo aos animais boas condições de saúde. Foram mantidos em um ciclo claro-escuro de 12 h (luz ligada às 6h e desligada às 18h), temperatura de $23 \pm 03^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa do ar de aproximadamente 65%. A ração, água filtrada ou solução etflica (conforme tratamento para o grupo ao qual pertenciam), foram fornecidas *ad libitum*.

O projeto foi desenvolvido em parceria com o Departamento de Morfologia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, onde foram realizados parte dos procedimentos experimentais (microtomia, imunoistoquímica e captura de imagens).

Todos os cuidados foram tomados no sentido de evitar dor e sofrimento aos animais durante os procedimentos experimentais, seguindo estritamente as normas e princípios estabelecidos pela Lei Arouca (11.794/08), para o uso científico de animais (BRASIL, 2008) e pela *National Research Council of the National Academy publicadas no livro "Guidelines for the Care and Use of Mammals in Neuroscience and Behavioral Research"*. Todos os procedimentos foram realizados somente após a aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-URCA), onde foi obtido o protocolo de aprovação de número 00159/2017-1 (Apêndices).

4.2 Protocolo experimental

4.2.1 Acasalamento

As ninhadas foram obtidas a partir do acasalamento programado de oito (08) fêmeas nulíparas (duas para cada grupo) com um macho adulto. Os acasalamentos ocorreram quando

as fêmeas estavam na fase do proestro ou estro do ciclo estral, cuja identificação foi feita através de coleta e análise microscópica do lavado vaginal. As análises foram realizadas no período da manhã e sempre no mesmo horário, às 8:00hs.

4.2.2 Coleta do lavado vaginal

Durante a realização do lavado vaginal, foi utilizada uma pipeta graduada com uma ponteira de polietileno, contendo 20 μ L de solução salina 0,9% a temperatura ambiente. As bordas da ponteira foram cortadas para ficarem rombas e assim não machucarem a parede vaginal; a ponta da ponteira era introduzida no orifício vaginal com cuidado para não estimular a cérvix uterina. A solução salina era então injetada, aspirada e colocada em uma lâmina. Sobre o líquido aspirado era acrescentado uma gota de Lugol, em seguida coberto com uma lamínula e levado para visualização ao microscópio com objetivas de 10 e 40 vezes possibilitando a análise e identificação do proestro ou estro do ciclo estral, pois devido à queda dos níveis de estradiol coincidentemente com a ovulação e formação do corpo lúteo, há diminuição da proliferação do epitélio vaginal, apresentando lavado vaginal constituído na sua grande maioria e/ou predominantemente de células cornificadas, gerando imagens com o aspecto de “folhas secas”.

4.2.3 Acasalamento programado

Após um período inicial de aclimação às caixas individuais, as camundongos fêmeas recebiam o macho para acasalamento à medida que apresentavam a fase proestro ou estro do ciclo estral, sendo sempre realizado o acasalamento de uma fêmea por vez, mantendo-se uma semana de diferença entre os grupos. Pouco antes do início do ciclo escuro, o macho era colocado na caixa da fêmea e na manhã seguinte era feita a confirmação da cópula por meio de observação do tampão vaginal (sêmen solidificado que tampona o canal vaginal das fêmeas). Posteriormente, realizou-se a coleta de secreção vaginal nas fêmeas para análise do lavado vaginal em microscópio óptico, objetivando identificar a presença de espermatozoides na amostra, a fim de confirmar o coito e assim retirar a fêmea do ciclo dos acasalamentos. Após a análise, as fêmeas possivelmente prenhes foram colocadas em gaiolas individuais (gaiolas maternidade) e passaram a receber tratamento de acordo com seu grupo experimental.

As fêmeas não prenhes, que ainda estavam na fase estro do ciclo estral retornavam ao acasalamento e no final do dia era realizada nova análise para confirmação de cópula.

O dia do nascimento dos filhotes foi considerado o dia 0 (zero). Após um período de 24h do nascimento (este período foi necessário para evitar rejeição da ninhada) cada ninhada foi reduzida para seis filhotes, mantendo-se três machos e três fêmeas (sempre que possível). Os filhotes descartados durante a redução da ninhada foram sacrificados por congelamento, conforme recomendação para eutanásia de recém-nascidos. A redução da ninhada para seis filhotes foi usada como padrão para que a competição pelas mamas não precisasse acontecer. Os filhotes foram pesados apenas após o desmame, a fim de evitar canibalismo da mãe para com os filhotes. O desmame para todos os animais experimentais foi feito no 21º dia de vida, quando então as mães foram separadas dos filhotes. Estes permaneceram com alimentação e água *ad libitum* até a idade do sacrifício (34–36 dias).

4.2.4 Grupos experimentais e dietas

Confirmada a prenhez, as matrizes foram colocadas em caixas individuais e passaram a ser tratadas conforme o protocolo adotado pelo grupo experimental ao qual pertenciam, sendo então divididas em 4 grupos distintos:

1 - Grupo controle (C) ($n=5$), sendo dois machos e três fêmeas.

Neste grupo as mães receberam alimentação e água *ad libitum* durante todo o período de gestação e aleitamento, e os filhotes receberam a mesma dieta durante o período pós desmame até a idade de 34 a 36 dias quando então foram perfundidos.

2 - Grupo ETOH gestação, **EtG** ($n=5$), sendo três machos e duas fêmeas.

Neste grupo as mães receberam ração *ad libitum* e solução etílica a 15% a partir do momento da confirmação da cópula até o nascimento dos filhotes. Após o nascimento, as mães passaram a receber água filtrada, e após o desmame os filhotes foram separados da genitora e receberam alimentação e água *ad libitum* até a idade do sacrifício.

3 - Grupo ETOH lactação, **EtL** ($n=5$), sendo dois machos e três fêmeas.

Neste grupo as mães receberam ração *ad libitum* e solução etílica a 15% a partir da data de nascimento dos filhotes até o momento do desmame. A partir de então, os filhotes foram separados e receberam alimentação e água *ad libitum* até a idade do sacrifício.

4- Grupo ETOH gestação e lactação, **EtGL** ($n=5$), sendo três machos e 2 fêmeas.

Neste grupo as mães receberam ração *ad libitum* e solução etílica a 15% a partir do momento do acasalamento e durante todo o período de amamentação até o desmame. Após o desmame os filhotes foram separados das mães e passaram a receber alimentação e água *ad libitum* até a idade do sacrifício.

Em todos os grupos, as mães, por ocasião dos desmames no 21º dia de vida dos filhotes, foram colocadas em gaiolas para repouso, recebendo água e ração *ad libitum* e posteriormente foram eutanasiadas, sendo utilizados exclusivamente os seus filhotes para todo o protocolo experimental restante.

Vale salientar que apenas as mães receberam a solução de ETOH (VETEC® 100% P.A) diluído em água na concentração de 15%, como única fonte de líquido, conforme o protocolo dos diferentes grupos experimentais. A partir do desmame e até o momento da perfusão, nenhum filhote ingeriu ETOH.

4.2.5 Peso corporal e encefálico

Os animais foram pesados aos 21 dias de idade (desmame) e no dia da perfusão (entre 34 e 36 dias de vida), utilizando-se para tanto uma balança eletrônica (MARTE, BL3200H). O peso encefálico foi aferido após sua retirada da caixa craniana e fixação em solução de Paraformaldeído 4% em TF. Para evitar problemas com canibalismo ou rejeição da ninhada, optamos por não pesar os animais após o nascimento.

4.2.6 Anestesia

Os animais foram anestesiados com uma injeção intramuscular de cloridrato de quetamina a 10% (0,1 ml/100g) e cloridrato de xilazina a 2% (0,05 ml/100g), até o animal atingir o plano anestésico. A quetamina é um anestésico dissociativo, que induz a um estado de sedação, imobilidade e analgesia. Já a xilazina é um relaxante muscular, que potencializa a ação anestésica.

4.2.7 Perfusão

Após atingir o plano anestésico, cada animal foi (1) posicionado em decúbito dorsal sobre tela de arame sob ponto de água; (2) submetidos à toracotomia, com incisão de pele,

músculos e arco costal, sendo estes removidos em bloco, para exposição do coração, seguido de (3) cardiopunção no ventrículo esquerdo, utilizando agulha de 16G (1,6 x 17 mm), a qual foi direcionada para a aorta ascendente, com posterior incisão no átrio direito. A perfusão ocorreu por gravidade; inicialmente foi administrado 250ml de solução salina a 0,9% em tampão fostato 0,1M, pH 7,4 (TF), acrescida com heparina (Parinex, Hipolabor, 2ml/1000 ml de solução salina). Logo em seguida, foi adicionado 300ml de solução fixadora de Paraformaldeído 4% em TF.

A utilização da solução heparinizada teve como objetivo lavar o sistema circulatório do animal, prevenindo a formação de coágulos e possibilitando a melhor penetração de fixador nos tecidos.

4.2.8 Remoção dos encéfalos

Logo após a perfusão, os encéfalos foram retirados do crânio e em seguida foram submetidos à fixação aldeídica (a mesma utilizada na perfusão) por duas horas. Posteriormente, foram lavados com TF e colocados em soluções crescentes de sacarose a 10, 20 e 30% em TF, até que houvesse a completa difusão. Os cérebros foram então guardados no freezer (-20°C) em solução anticongelante, até serem submetidos à microtomia.

4.2.9 Microtomia

Os encéfalos foram cortados em um criostato (LUPETEC, CM 2850), obtendo-se cortes coronais de 30 µm, os quais foram distribuídos sequencialmente em cinco compartimentos, em um meio líquido contendo solução anticongelante. Cada um desses compartimentos continha uma de cinco secções, de maneira que a distância entre uma secção e a seguinte foi de aproximadamente 150 µm. As secções armazenadas na solução anticongelante foram conservadas a -20° C até a realização das reações imunoistoquímicas ou até a coloração pelo método de Nissl com corante tionina.

4.2.10 Marcação de Nissl e Imunoistoquímica

Dos cinco compartimentos, um foi submetido à coloração citoarquitetônica pelo método de Nissl, utilizando o corante tionina. Através dessa técnica todas as células foram marcadas,

sendo possível identificação de seus tamanhos, formas, localizações e delimitação dos núcleos. Esse procedimento foi feito com cada um dos animais utilizados, uma vez que podem ocorrer diferenças individuais nas estruturas encefálicas.

As demais séries foram submetidas à análise imunistoquímica com anticorpo anti-5-HT, empregando o protocolo ABC (avidina-biotina-complexo peroxidase). Todos os procedimentos imunistoquímicos seguiram o mesmo protocolo para ambos os grupos. As secções de cada compartimento foram lavadas (cinco lavagens de 5 minutos) em TF em agitador orbital e posteriormente foram submetidas ao pré-tratamento para abolição de artefatos e recuperação de antigenicidade, com boridreto de sódio e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 0,3% em TF por 20 minutos. Na sequência, foram incubados em BSA 10%, diluído em TF 0,1M, pH 7,4, contendo Triton X-100 0,4% durante 60 minutos.

Logo em seguida, os cortes foram colocados em contato com o anticorpo primário específico (Tabela 2) diluído em TF contendo Triton X-100 a 0,4% com BSA a 2%, overnight (25°C) sob agitação constante, automática. Ao fim deste período, os cortes foram submetidos a cinco lavagens de 5 min. cada, e em seguida foram colocados em contato com o anticorpo secundário biotilado com Triton X-100 a 0,4% por 90 minutos à temperatura ambiente, sob agitação lenta, em agitador. Em seguida os cortes foram submetidos a cinco lavagens de 5 min. cada, e colocados na solução do complexo avidina-biotina-HRP (Protocolo ABC, Kit elite da Vector) em Triton X-100 a 0,4%, contendo NaCl. Para visualizar a reação, as secções foram postas em meio contendo H₂O₂, como substrato, e DAB (3,3',4,4'tetrahidrocloro-diaminobenzidina) a 2,5% diluída em TF, como cromógeno. Esta reação durou aproximadamente 15 minutos. Entre cada uma das etapas, as secções foram lavadas por cinco vezes em TF no agitador orbital.

4.2.11 Montagem de lâminas e intensificação com Tetróxido de Ósmio

Após a reação imunistoquímica, os cortes foram montados sequencialmente em lâminas gelatinizadas com gelatina-alúmen-cromo (VETEC®), que após secas a temperatura ambiente, foram imersas em solução de tetróxido de ósmio a 0,05% por 30 segundos, com o intuito de intensificar a reação. Após as etapas de desidratação, em baterias de álcool de graduação crescente até o álcool absoluto, e diafanização em xilol, foram montadas as lamínulas.

Tabela 2: Especificações do anticorpo primário, anticorpo secundário e soro normal utilizados no procedimento imunistoquímico com as suas referidas diluições e fabricantes.

ANTÍGENO	ANTICORPO PRIMÁRIO	ANTICORPO SECUNDÁRIO	SORO NORMAL
5-HT	Coelho [1:5.000] Sigma Anti – 5-HT	Cabra [1:1.000] Jackson Anti – coelho	BSA

4.2.12 Obtenção e análise de imagens

As imagens foram obtidas em campo claro utilizando um microscópio ótico, (Nikon ECLIPSE Ni) acoplado a uma videocâmera digital (Nikon DS-Ri) conectada a um computador instalado com o software NIS. As imagens foram feitas das secções coronais dos encéfalos, coradas pelo método de imunistoquímica anti-5HT e Nissl, para análise morfométrica do DR e MnR. O software Canvas X 2018 foi utilizado para a construção dos esquemas, tomando como base o atlas estereotáxico do cérebro de camundongos (Paxinos e Watson, 2007).

4.2.13 Densidade óptica relativa (DOR)

Para realizar a DOR, foram utilizados corte coronais submetidos à imunistoquímica contra 5-HT e que continham marcados os núcleos de interesse para nosso estudo. Para cada animal foram obtidas todas as imagens necessárias para que as áreas de interesse fossem amostradas desde o nível rostral até o caudal.

Para tanto, utilizando o software ImageJ (versão 1.51w NIH), campos com área semelhante foram traçados nos núcleos de interesse e medida a intensidade de imunomarcção para 5-HT. Para cada corte, foi traçado um campo de medição de igual tamanho em uma área controle sem nenhuma marcação de 5-HT no tecido, que serviu para a normalização dos valores em todos os núcleos daquele corte, uma vez que as imunistoquímicas foram realizadas em momentos diferentes e assim poderiam apresentar backgrounds diferenciados entre os animais e entre cortes.

Cada campo de medida gerado no Image J, forneceu uma área, uma média de pixels e seu desvio padrão. A partir da média de pixels por campo, foi realizada uma média geral de pixels por corte para cada lâmina. Então, esse valor médio de pixels obtido e o valor de pixels da área controle do mesmo tecido foram utilizados na seguinte fórmula:

$DOR = \{(DO_{AI} - DO_{AC})/DO_{AC}\} * 100$, onde: DO_{AI} = densidade óptica da área de interesse e DO_{AC} = densidade óptica da área controle.

A partir deste método, foi possível estimar a intensidade de marcação dos neurônios imunorreativos a 5-HT nos núcleos de interesse.

4.2.14 Análise estatística

Para todas as análises utilizou-se o *software GraphPad Prism 6.0*. As diferenças entre dados com uma única variável foram determinadas por meio da Análise de Variância (ANOVA) *one-way*, para as análises de dados com mais de uma variável foi utilizado a ANOVA *two-way*, em seguida para ambas as análises foi realizado o teste de *Bonferroni* e teste 't' *post hoc*. O nível de significância para rejeição da hipótese de nulidade foi 0,05 ($p < 0,05$). Os valores estão expressos como média \pm erro padrão da média.

5. RESULTADOS

5.1 Delimitação e identificação citoarquitetônica dos núcleos DR e MnR

Os resultados obtidos através das secções coradas pelo método de Nissl, possibilitaram a representação citoarquitetônica esquemática, delimitando os núcleos DR e MnR da rafe, conforme ilustrado na Fig.9, tendo por base as referências do atlas estereotáxico para camundongos (Paxinos e Watson, 2007).

A figura 10 ilustra a delimitação desses núcleos, contendo células imunorreativas a 5-HT, desde o plano mais rostral, onde o grupamento serotoninérgico do DR apresenta-se com um formato mais triangular, e observa-se logo abaixo do MnR o grupamento B9 (Fig. 10A), quanto no plano caudal, onde o DR é mais arredondado, e o grupamento B9 está ausente (Fig. 10B).

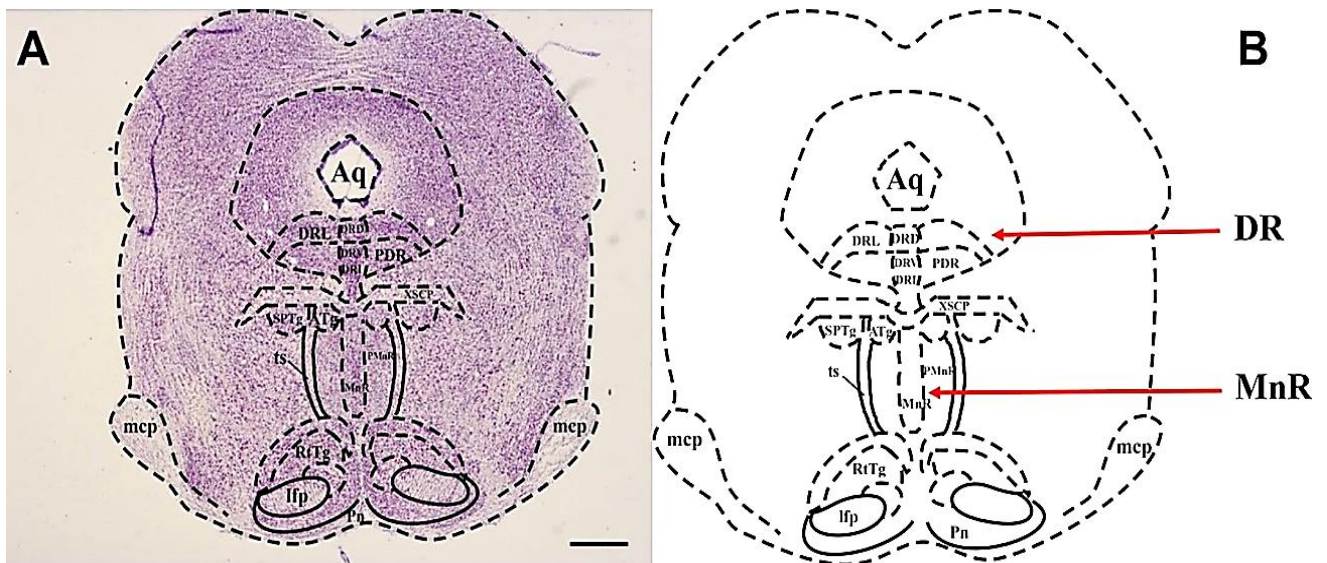


Figura 9. Fotomicrografia em campo claro de secção coronal no sentido rostrocaudal corada pelo método de Nissl (A), e representação esquemática ilustrando a distribuição dos núcleos dorsal (DR) e Mediano (MnR) da rafe em um nível mais caudal (B). Barra: 500 μ m.

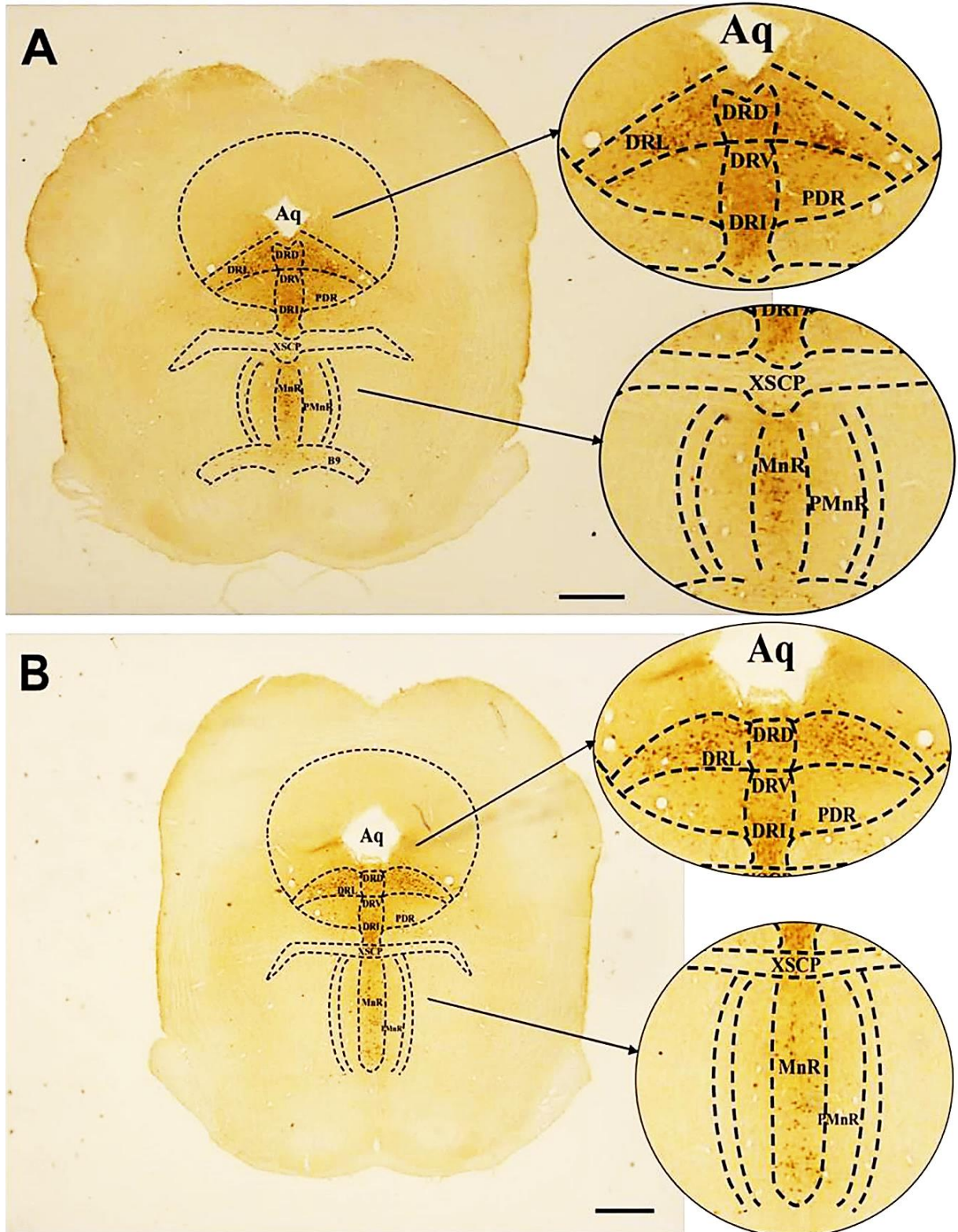


Figura 10. Fotomicrografia em campo claro de secções coronais no sentido rostrocaudal com representação esquemática do DR e MnR em um plano rostral (A) e caudal (B); os balões indicados pelas setas representam uma magnificação da área destes núcleos, marcados pelo método de imunohistoquímica para 5-HT. **Aq:** aqueduto cerebral. **DRL:** parte lateral do núcleo dorsal da rafe. **DRD:** parte dorsal do núcleo dorsal da rafe. **DRV:** parte ventral do núcleo dorsal da rafe. **DRI:** parte interfascicular do núcleo dorsal da rafe **PDR:** núcleo póstero dorsal da rafe. **XSCP:** decussação do pedúnculo cerebelar superior, **MnR:** núcleo mediano da rafe e **PMnR:** núcleo paramediano da rafe. Barra: 500 μ m.

5.2 Imunorreatividade do DR e densidade óptica relativa

No presente estudo, foi possível observar claras diferenças na reação de imunistoquímica anti-5-HT entre o grupo controle e os grupos experimentais, onde os neurônios dos animais controle estão sempre em maior número e com maior intensidade na reação imunistoquímica quando comparados aos grupos alcoólicos.

A figura 11 ilustra um painel contendo secções imunorreativas a 5-HT, com delimitação citoarquitetônica do núcleo DR, evidenciando modificações na intensidade de marcação dos neurônios serotoninérgicos tanto do DR-rostral, quanto caudal, dos grupos EtG, EtL e EtGL quando comparados ao controle. Os neurônios 5-HT imunorreativos do grupo controle (Fig. 11 A e E) apresentam-se visualmente em maior número e com maior intensidade de marcação na reação imunistoquímica em relação aos grupos cujas mães ingeriram solução etílica a 15% apenas durante a gestação (grupo EtG - Fig. 11 B e F), apenas durante o período de lactação (grupo EtL - Fig. 11 C e G), assim como o grupo que recebeu ETOH durante os períodos de gestação e lactação (grupo EtGL - Fig. 11 D e H).

Os resultados da análise da densidade óptica relativa (DOR) para todo o DR (Fig. 12) indicam que, estatisticamente, existem diferenças significativas entre cada um dos grupos experimentais ($p \leq 0,0001$) em relação ao controle-CL. Quando a comparação é feita entre os três grupos que ingeriram ETOH, o que apresentou menor intensidade na marcação de 5-HT foi o grupo EtL, tanto na porção rostral quanto caudal. No nível rostral, o grupo EtG apresenta uma maior imunorreatividade do que o grupo EtGL, mas essa diferença não se mantém quando se observa o DR caudal, onde ambos se apresentam com uma imunorreatividade semelhante.

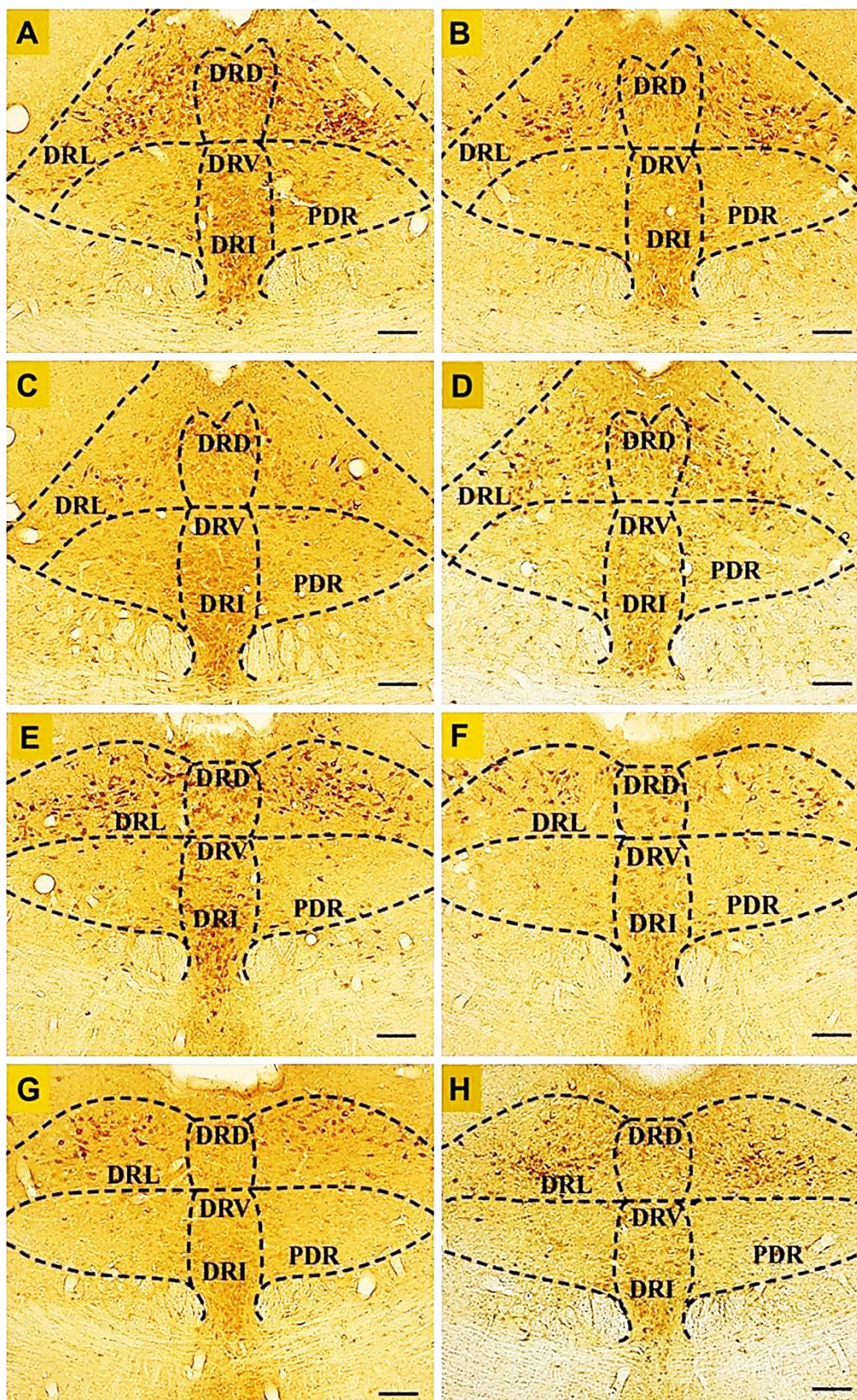


Figura 11. Fotomicrografia em campo claro de secções coronais no sentido rostrocaudal do DR (rostral), coradas pelo método de imunistoquímica para 5-HT de animais **A** e **E**: Controle, **B** e **F**: EtG, **C** e **G**: EtL, **D** e **H**: EtGL. **Aq**: aqueduto. **DRL**: parte lateral do núcleo dorsal da rafe. **DRD**: parte dorsal do núcleo dorsal da rafe. **DRV**: parte ventral do núcleo dorsal da rafe. **DRI**: parte interfascicular do núcleo dorsal da rafe **PDR**: núcleo póstero dorsal da rafe. Barra: 100µm.

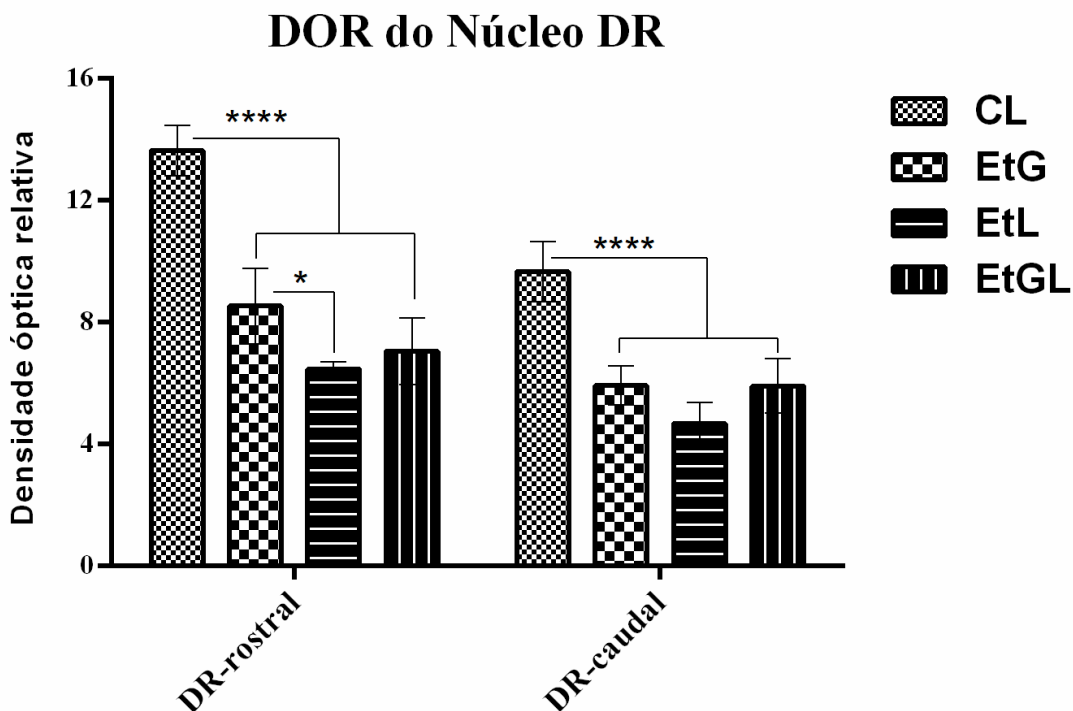


Figura 12. Densidade óptica relativa (DOR) dos neurônios imunorreativos à 5-HT no DR (rostral/caudal). As colunas representam a média \pm E.P.M., analisados através da ANOVA *two-way* ($p < 0,05$), seguida pelo teste de *Bonferroni* e teste 't' *post hoc*. Valores significativos "*" ($p < 0,05$) e "****" ($p \leq 0,0001$), demonstram as comparações entre as médias do grupo controle em relação aos grupos alcoólicos (ETOH 15%), EtG, EtL, e dos grupos alcoólicos entre si.

5.3 Imunorreatividade do MnR e Densidade óptica relativa

A figura 13 ilustra secções imunorreativas a 5-HT no MnR. Também nesse núcleo, todos os grupos apresentam uma menor intensidade de marcação quando comparados ao grupo controle, e o grupo EtL é o que apresenta menor imunorreatividade.

A análise da DOR para todo o MnR (Fig. 14) demonstra uma redução nos diferentes grupos alcoólicos, com diferença significativa de $p \leq 0,0001$ para todos eles quando comparados ao controle-CL, mas quando comparados entre si, não se observa diferença significativa.

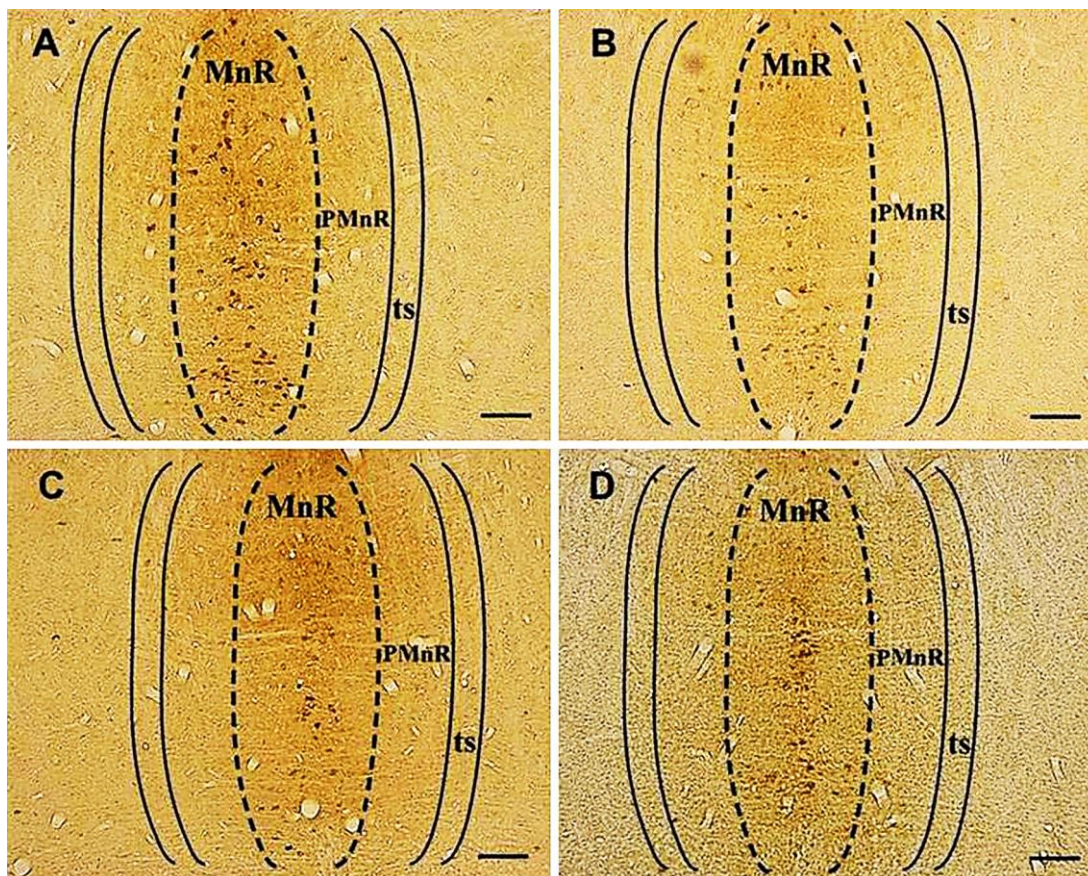


Figura 13. Fotomicrografia em campo claro de seções coronais no sentido rostrocaudal do MnR, coradas pelo método de imunistoquímica para 5-HT de animais **A:** Controle, **B:** EtG, **C:** EtL, **D:** EtGL. **MnR:** núcleo mediano da rafe, **PMnR:** núcleo paramediano da rafe e **ts:** trato tectoespinal. Barra: 100 μ m.

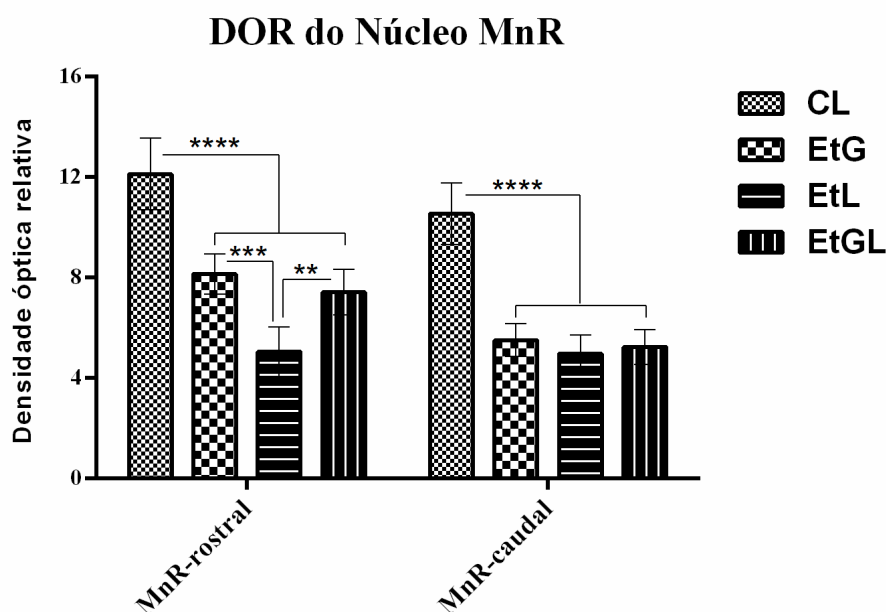


Figura 14. Densidade óptica relativa (DOR) dos neurônios imunorreativos a 5-HT no MnR (rostral/caudal). As colunas representam a média \pm E.P.M., analisados através da ANOVA *two-way* ($p < 0,05$), seguida pelo teste de *Bonferroni* e teste ‘*t*’ *post hoc*. Valores significativos “***” ($p < 0,01$), “****” ($p < 0,001$) e “*****” ($p \leq 0,0001$), demonstram as comparações entre as médias do grupo controle, em relação aos grupos alcoólicos (ETOH 15%), EtG, EtL, EtGL e dos grupos alcoólicos entre si.

5.4 Massa corporal

Os resultados para a massa corporal aos 21 dias, pós-desmame, e aos 34/36 dias encontram-se ilustrados na figura 15 e na Tabela 3, e evidenciam que houve redução na massa corporal, em ambos os períodos, apenas para os grupos cujas mães receberam ETOH a 15% durante o período de lactação (EtL) e gestação/lactação (EtGL), quando comparados ao controle.

Aos 21 dias, os grupos EtL e EtGL apresentaram redução da massa corporal em relação ao controle-CL, com diferença significativa de $p \leq 0,0001$.

Aos 34/36 dias, o grupo EtL teve uma redução em relação ao grupo CL com $p \leq 0,01$, e em relação ao grupo EtG de $p \leq 0,001$.

O grupo EtG, não apresentou diferença significativa da massa corporal em nenhum dos períodos analisados, mas apresentou-se um pouco mais elevado do que o grupo controle no período entre os 34/36 dias.

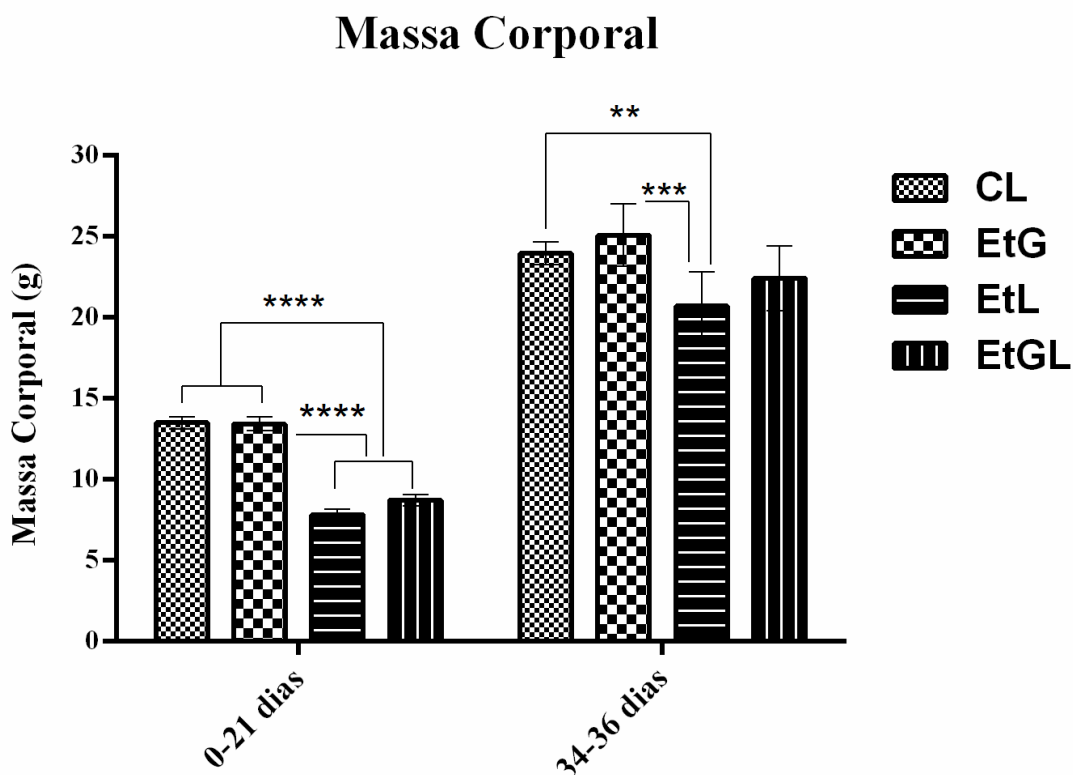


Figura 15. Massa corporal aos 21 dias (pós desmame) e aos 34/36 dias (perfusão). As colunas representam a média \pm E.P.M., analisados através da ANOVA *two-way* ($p < 0,05$), seguida pelo teste de *Bonferroni* e teste 't' *post hoc*. Valores significativos "***" ($p < 0,01$), "****" ($p < 0,001$) e "*****" ($p \leq 0,0001$), demonstram as comparações entre as médias do grupo controle "a", em relação aos grupos alcoólicos (ETOH 15%), EtG, EtL, EtGL e dos grupos alcoólicos entre si.

5.5 Massa encefálica

Na análise do gráfico relativo à massa encefálica (Fig. 16), observa-se redução com diferença significativa para os grupos EtL ($p \leq 0,1$) e EtGL ($p \leq 0,5$), quando comparados ao controle, e assim como nos resultados para a massa corporal, o grupo EtG, também não apresentou alterações.

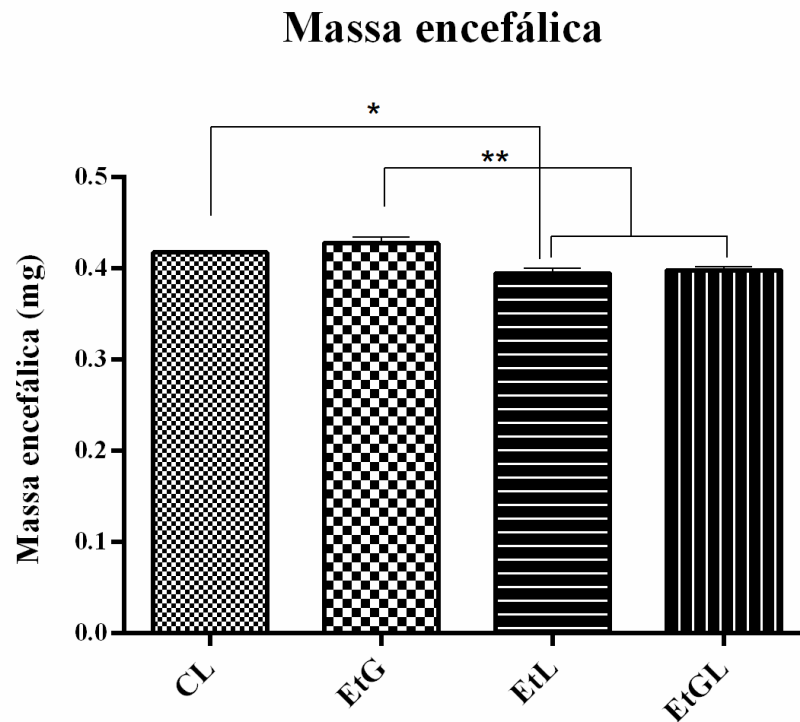


Figura 16 - Massa encefálica aos 34/36 dias. As colunas representam a média \pm E.P.M., analisados através da ANOVA *two-way* ($p < 0,05$), seguida pelo teste de *Bonferroni* e teste 't' *post hoc*. Valores significativos "*" ($p < 0,05$) e "**" ($p < 0,01$), demonstram as comparações entre as médias do grupo controle "a", em relação aos grupos alcoólicos (ETOH 15%), EtG, EtL, EtGL e dos grupos alcoólicos entre si.

6. DISCUSSÃO

Filhos de mães usuárias de ETOH durante a gravidez são conhecidos por sofrer atrasos no desenvolvimento e/ou uma variedade de mudanças comportamentais (ORNOY; ERGAZ, 2010). Os sistemas neurotransmissores (serotonina, dopamina, glutamato e GABA) têm sido reconhecidos como importantes alvos das ações do ETOH durante o desenvolvimento, desencadeando problemas como ansiedade, depressão, déficits de aprendizado, memória, atenção e coordenação motora (VALENZUELA; PUGLIA; ZUCCA, 2011).

Neste trabalho, utilizamos o ETOH em uma concentração de 15%, para testar a hipótese da sua influência sobre o desenvolvimento de dois núcleos serotoninérgicos (DR e MnR da rafe), e sobre o peso corporal e encefálico de proles expostas ao ETOH em estágios de desenvolvimento pré e pós-natal. Os neurônios contendo 5-HT estão na maior parte agrupados dentro dos núcleos da rafe, alinhados em ambos os lados da linha medial do tronco encefálico, onde podem ser divididos em um grupo caudal ou posterior e grupo rostral ou anterior (TORK, 1985; LENT, 2005; BEAR; CONNORS; PARADISO, 2008).

Na análise do peso encefálico como um todo, observamos uma redução de 5,2% no grupo EtL e de 4,3% no EtGL em relação ao grupo controle, imediatamente após a perfusão. Quando procedemos a análise da densidade óptica relativa dos neurônios 5-HT, identificamos que houve uma redução de 37,5 a 51,5% no núcleo DR e de 40 a 55,5% no MnR quando comparados ao grupo controle. Mais especificamente, o grupo EtG apresentou uma redução de 37,5%, o EtL de 51,5% e o EtGL de 43% no DR, enquanto no MnR as reduções foram de 40% para o EtG, 55,5% para o EtL e de 44,5% para o grupo EtGL.

Embora haja um número substancial de células não serotoninérgicas nos núcleos da rafe, é reconhecido que as longas projeções ascendentes e descendentes são oriundas de neurônios serotoninérgicos, e as projeções ascendentes são oriundas principalmente de núcleos serotoninérgicos rostrais, como os núcleos DR e MnR da rafe, onde ocorre a maior síntese de 5-HT (JACOBS; AZMITIA, 1992; CHARARA; PARENT, 1998; HALBERSTADT; BALABAN, 2006; UNDERWOOD; MANN; ARANGO, 2007).

Estes núcleos estão entre os primeiros a expressar 5-HT. O conjunto rostral é o primeiro a ser detectável utilizando a imunistoquímica para 5-HT, cujas células são evidentes entre os dias embrionários (E12-15). A imunorreatividade da 5-HT aparece no grupo caudal em torno de E14, embora os estudos de nascimento sugiram que essas células nascem ao mesmo tempo em que as células rostrais (E11-12) (RUBENSTEIN, 1998). Os

núcleos da rafe rostral produzem projeções axonais que ascendem ao mesencéfalo e ao prosencéfalo, enquanto que os núcleos da rafe caudal produzem axônios que descem para a medula espinhal (MOLLIVER, 1987; AITKEN; TORK, 1988; WALLACE; LAUDER, 1992).

Através das secções coradas pelo método de Nissl, identificamos e delimitamos citoarquiteticamente os núcleos DR e MnR da rafe, desde o plano mais rostral, onde o grupamento serotoninérgico do DR apresenta-se com um formato mais triangular e observa-se logo abaixo do MnR o grupamento B9, quanto no plano caudal, onde o DR é mais arredondado e o grupamento B9 está ausente.

Uma distribuição diferencial da inervação serotoninérgica proveniente dos núcleos DR e MnR foi inicialmente sugerida em um estudo autorradiográfico realizado por Azmitia e Segal (1978), no que foram corroborados por estudos em que as fibras do MnR distribuem-se principalmente para estruturas medianas e paramedianas, enquanto que o DR emite projeções primariamente para estruturas mais laterais, e a área B9 parece projetar-se principalmente para o córtex frontal; esta projeção diferencial também é vista nos centros circadianos, onde o MnR emite projeções diretas para o Núcleo Supraquiasmático (NSQ) e o DR para o Folheto Intergeniculado (FIG) onde a 5-HT modula a atividade nessas áreas de controle do ritmo circadiano (KENT; SLADEK, 1978; MOORE et al., 1978; STEINBUSCH, 1981; TORK, 1985; IMAI et al., 1986; VERTES, 1991; JACOBS; AZMITIA, 1992; WESTRICH; SPROUSE; SÁNCHEZ, 2013).

Projeções serotoninérgicas oriundas de núcleos rostrais se estendem caudalmente até estruturas mesodiencefálicas, como a área pré-tectal, e mesmo mesencefálicas e pontinas, como o núcleo tegmentar látero-dorsal, a substância cinzenta central, a substância negra parte compacta, o locus ceruleus e outros núcleos da rafe. Praticamente todo o córtex recebe inervação serotoninérgica, observando-se uma maior densidade no córtice perirrinal, occipital, córtex frontal, giro do cíngulo, área entorrinal, área amigdalóide e hipocampo (AZMITIA; SEGAL, 1978; KENT; SLADEK, 1978; MOORE et al., 1978; STEINBUSCH, 1981; TORK, 1985; VERTES, 1991; JACOBS; AZMITIA, 1992; PINATO et al., 2007).

As aferências que chegam aos núcleos DR e MnR são provenientes de áreas muito amplas principalmente dos córtices pré-frontal, cíngulo anterior, insular, orbital (lateral, medial e ventral), infralímbico, peduncular dorsal e ténia tecta, núcleo amigdalóide, prosencéfalo basal, núcleos habenuares, vários núcleos hipotalâmicos, tálamo, incluindo o

núcleo paraventricular, zona incerta e núcleo subtalâmico (TORK, 1985; PEYRON et al., 1998) e retina (FITE et al., 1999; FRAZÃO et al., 2008).

Diante da ampla distribuição das fibras serotoninérgicas provenientes dos núcleos DR e MnR da rafe, buscamos em nosso trabalho, demonstrar como estes núcleos respondem imunorreativamente aos efeitos teratogênicos provocados pelo ETOH quando ingerido nos períodos pré e/ou pós-natal, uma vez que, além de sua função de neurotransmissor "clássico", a 5-HT também atua como sinal de desenvolvimento neurológico, estando presente primariamente no desenvolvimento do SNC mais do que em outros sistemas transmissores de monoamina, apresentando níveis mais elevados no cérebro de mamífero imaturo e maior atividade do que em qualquer outro período (HAMON; BOURGOIN, 1979; LIDOV; MOLLIVER, 1982).

Foram observadas claras diferenças na reação de imunistoquímica anti-5-HT entre o grupo controle e os grupos experimentais, onde os neurônios dos animais controle estão sempre em maior número e com maior intensidade na reação imunistoquímica quando comparados aos grupos alcoólicos. A redução na imunorreatividade dos grupos alcoólicos demonstra que houve uma redução no número de neurônios que secretam 5-HT, coerente com trabalho de Tajuddin e Druse (1999), onde asseguram que o ETOH retarda severamente o desenvolvimento do sistema 5-HT, provocando uma redução na concentração de 5-HT dos seus locais de recaptção e alterações na concentração de receptores 5-HT_{1A} na prole, e adicionalmente, reduz a densidade de neurônios imunorreativos a 5-HT no ramo dorsal, mediano da rafe e neurônios B9, com uma redução de 28% - 40% (TAJUDDIN; DRUSE, 1999).

De modo geral, através da análise da imunorreatividade dos neurônios 5-HT, bem como da densidade óptica relativa que realizamos, constatamos uma redução dos neurônios 5-HT nos núcleos DR e MnR da rafe tanto no plano rostral quanto caudal dos grupos alcoólicos, em consonância com um trabalho realizado por Lo e Zhou (2014), onde eles descrevem reduzidos níveis de 5-HT no cérebro de indivíduos que ingeriram álcool durante o desenvolvimento já no dia embrionário E13, além de reduções nos níveis de outros neurotransmissores como dopamina, noradrenalina, adrenalina, e GABA (LO; ZHOU, 2014).

A redução no número total de neurônios imunorreativos a 5-HT no DR e MnR, também foi demonstrada em um trabalho realizado por Sari e Zhou (2004), ao usarem um modelo de exposição ao ETOH a 25% durante a gestação, ocasião em que eles detectaram uma redução de 20% no peso cerebral e no número total de neurônios imunorreativos a 5-HT tanto no DR

quanto no MnR, no dia embrionário (E18) em comparação com o controle. A diminuição do número de neurônios 5-HT persistiu no estágio adulto jovem do dia pós-natal (P45). Embora estes autores tenham usado uma dose de ETOH superior à que utilizamos, estes dados demonstram que o ETOH contribui significativamente para a redução do número de neurônios 5-HT no DR e MnR durante o desenvolvimento, e que esta redução persiste na idade adulta. Este fato pode possivelmente explicar a redução da imunorreatividade a 5-HT evidenciada em nossos estudos tanto no DR quanto no MnR dos grupos alcoólicos. Outros estudos realizados com roedores mostram que a exposição ao ETOH durante o desenvolvimento pré-natal reduz tanto o número de neurônios imunorreativos a 5-HT no DR quanto as projeções desses neurônios (DRUSE et al., 2004; ZHOU et al., 2005; SLIWOWSKA et al., 2014).

Reduções nos níveis de 5-HT podem trazer prejuízos ao desenvolvimento. A diminuição pré-natal da 5-HT atrasa o início da neurogênese em regiões alvo serotoninérgicas. Tanto a inibição da síntese como as lesões seletivas de neurônios serotoninérgicos estão associadas a diminuições no número de células recém-geradas no giro dentado, bem como na zona subventricular (BREZUN; DASZUTA, 1999).

A exposição pré-natal ao ETOH retarda a migração e o desenvolvimento de neurônios de 5-HT, e como eles estão implicados para sinalizar a maturação cerebral, menos neurônios 5-HT podem ter efeitos duradouros no desenvolvimento do cérebro ou, se persistentes no adulto, podem afetar profundamente a função cerebral adulta (ZHOU et al., 2000), e dessa forma comprometer o desenvolvimento da linha média da rafe e os neurônios da 5-HT nele contidos (ZHOU; SARI; POWROZEK, 2005). Poucas fibras de 5-HT crescem nos embriões expostos ao ETOH. A diminuição da inervação da 5-HT correlaciona-se com o número reduzido de fibras talamocorticais, bem como a diminuição do tamanho das regiões alvo de axônios serotoninérgicos, incluindo o hipotálamo, córtex cerebral e hipocampo. O subsequente atraso do crescimento do prosencéfalo e as fibras sensoriais talamocorticais ao longo da via de projeção reduzida de 5-HT é consistente com o papel da 5-HT como um sinal para a diferenciação do prosencéfalo, conseqüentemente, o desvio da 5-HT no início da vida pode ter conseqüências sobre o desenvolvimento do cérebro que se estende além dos observados no sistema 5-HT (ZHOU, 2002; ZHOU et al., 2005).

Quando comparamos a imunorreatividade dos neurônios 5-HT, bem como a densidade óptica relativa nos núcleos DR e MnR dos grupos alcoólicos entre si, constatamos que de modo geral, os grupos em que as proles foram expostas ao ETOH durante o período de

lactação ou gestação-lactação, apresentaram diferença significativa não só em relação ao controle, mas também em relação ao grupo exposto ao ETOH apenas durante a gestação. Tal fato pode estar associado à presença do ETOH durante este período de desenvolvimento. Em humanos, sabe-se que quando as mulheres que estão amamentando consomem ETOH, de forma geral, cerca de 2% deste é transferido para o sangue e leite materno. Apesar de não ser estocado nas glândulas mamárias, o nível de ETOH encontrado no leite é proporcional ao encontrado no sangue da mãe e, desta forma, o leite apresentará quantidades consideráveis de ETOH enquanto os níveis no sangue forem mensuráveis (MENNELLA, 2001; CHAVES, 2004).

Uma vez presente no leite materno, o álcool ingerido pelo recém-nascido pode provocar perturbações ao desenvolvimento dos neurônios 5-HT, uma vez que a etapa mais vulnerável do desenvolvimento do SNC, à desnutrição e a outros insultos, é o “período crítico de crescimento cerebral”, isto é, o período de pico da atividade de eventos específicos (neurogliogênese, migração e diferenciação celular). Este período é muito vulnerável à ação apoptogênica do ETOH. Em ratos e camundongos este período ocorre a partir do nascimento, em torno dos primeiros 10 dias pós-natal, coincidente com o período do aleitamento (0 a 21 dias pós-natal) (DOBBING, 1968; KACHANI et al., 2008).

Reduções nos níveis de 5-HT durante o período pós-natal em ratos e camundongos, pode acarretar em sérios prejuízos para o desenvolvimento do cérebro, uma vez que durante as primeiras duas semanas de vida pós-natal destes animais (equivalente ao terceiro trimestre da gravidez humana), os neurônios 5-HT sofrem uma maturação funcional significativa e seus axônios atingem regiões alvo no prosencéfalo (por exemplo, córtex e hipocampo) (MOHAJERANI; CHERUBINI, 2006, LOHMANN; KESSELS, 2014). O número de sinapses aumenta drasticamente durante este período e a atividade espontânea impulsiona a formação e o refinamento precoce das redes neuronais hipocampais (MOHAJERANI; CHERUBINI, 2006; LOHMANN; KESSELS, 2014).

Além disso, durante este período há um aumento nos níveis de 5-HT, que promove a maturação dendrítica e regula os níveis de fatores neurotróficos derivados do cérebro no desenvolvimento do hipocampo (GASPAR et al., 2003; FREDERICK; STANWOOD, 2009; MIGLIARINI et al., 2013). Os neurônios 5-HT no DR em desenvolvimento são suscetíveis a perturbações nas três primeiras semanas de vida pós-natal, possibilitando a ocorrência de mudanças funcionais significativas (ROOD et al., 2014). Portanto, o sistema neurotransmissor 5-HT é altamente sensível durante este período de desenvolvimento, tornando-o

potencialmente suscetível a uma série de insultos. Entre os fatores que podem ter impacto no sistema neurotransmissor 5-HT, o mais citado é a exposição fetal ao ETOH, que é também uma das principais causas de deficiência intelectual em todo o mundo (MURAWSKI et al., 2015; ROOZEN et al., 2016). De modo geral, estes estudos sugerem que o desenvolvimento e maturação normal do cérebro, depende dos níveis de 5-HT.

Em nosso trabalho, a ingestão de ETOH materno se deu exclusiva e pontualmente durante a gestação e/ou lactação, conforme cada grupo, onde as mães não foram submetidas a nenhuma dieta alcoólica antes destes períodos e assim, os efeitos sobre a prole se deu em decorrência da ingestão alcoólica materna, enquanto sua condição de gestante ou lactante, provocando prejuízos para o desenvolvimento da prole, diferindo entretanto, de um trabalho realizado em ratos por Evrard e colaboradores (2003), em que as mães foram submetidas a uma dieta líquida de ETOH a 6,6% por seis semanas antes e durante a gestação e lactação, sendo relatado aumento nos níveis de neurônios 5-HT imunorreativos nos núcleos DR e MnR da prole, sendo mais significativo para o MnR. Nesse trabalho, as fibras 5-HTT-IR também não apresentaram alterações morfológicas em relação ao controle, e as áreas prosencefálicas de inervação serotoninérgicas como a inervação do MnR foram as áreas onde o 5-HTT-IR apresentou maior aumento em sua área relativa (germinação de fibras). Portanto, nesse modelo de exposição, o ETOH pode atuar como um fator de aceleração do desenvolvimento induzindo uma maturação e desenvolvimento acelerados, ao contrário de outros modelos nos quais altos níveis de ETOH geralmente causam amadurecimento tardio no desenvolvimento do SNC.

Em nosso trabalho observamos uma diminuição de peso corporal nos animais do grupo EtL e EtGL em relação ao controle. Nossos resultados corroboram os estudos de Fuentes et al (2001), onde a administração crônica de ETOH a 20% durante a lactação ou gestação e lactação, afetou negativamente o crescimento dos filhotes no desmame, com redução significativa de peso corporal ao longo do período de amamentação, redução no consumo de leite, e diminuição de órgãos como fígado e rins. E assim como em nosso trabalho, a redução de peso corporal durante a lactação foi mais significativa neste período do que durante a gestação ou gestação-lactação. Othman et al (2002), também sugerem que o consumo de leite associado a 15% de ETOH, provoca redução de peso corporal e cerebral, bem como de receptores, RNA e densidade proteica do córtex e cerebelo. E ainda, modificação do comportamento de sucção dos recém-nascidos, com redução na atividade global do sistema motor (CHESLOCK et al., 2000).

A toxicidade da exposição materna ao ETOH foi demonstrada pela diminuição do peso corporal da prole após o período de amamentação (CESCONETTO et al., 2016). A redução de peso corporal também foi relatada por Oyama et al (2000), em animais expostos a soluções de ETOH a 10% e 20% durante a lactação. Estudos anteriores a estes já demonstravam resultados semelhantes, com redução de peso corporal e do cérebro (DETERING et al., 1979), pois além do retardo de crescimento, a ingestão crônica de ETOH durante estes períodos prejudica o desempenho da lactação, uma vez que afeta a função das glândulas mamárias, com conseqüente declínio na produção de leite e alterações na sua composição (VILARÓ et al., 1987). A falta de disponibilidade de leite para as proles cujas mães receberam ETOH durante a lactação, tem sido apontada como o principal fator que causa a desnutrição severa observada nesses filhotes, e isto pode estar de certa forma, relacionado ao fato de que a ingestão de ETOH inibe o reflexo de ejeção do leite, causando uma diminuição temporária de sua produção (MENNELLA; PEPINO; TEFF, 2005; MENELLA; PEPEINO, 2008; HAASTRUP; POTTEGARD; DAMKIER, 2014).

As reduções nos níveis de leite materno são geralmente associadas a alterações nos níveis de prolactina e ocitocina. A redução da ocitocina está relacionada com a diminuição na ejeção e no rendimento do leite e em consequência disto, na redução da ingestão de até 20% do leite, o que faz com que o recém-nascido o consuma em menores quantidades (MENELLA, 2001; KACHANI et al., 2008), e isso contribui potencialmente para a ocorrência de perturbações no desenvolvimento do lactente, como evidenciado inclusive em seres humanos, através de um estudo realizado por Backstrand e colaboradores (2004), onde a ingestão de bebidas alcoólicas por mulheres que estavam amamentando, foi associada com peso baixo, crescimento lento e menor tamanho alcançado aos 57 meses de idade em seus filhos.

Adicionalmente, é importante salientar que parte do ETOH ingerido pela mãe passa para o leite materno (MENNELLA; BEAUCHAMP, 1993), e os recém-nascidos metabolizam mais lentamente o ETOH, estimando-se que seja cerca de metade da taxa de metabolização de um adulto. Logo, o ETOH permanece mais tempo no seu organismo (HAASTRUP; POTTEGÅRD; DAMKIER, 2014), e assim, essa presença mais demorada no organismo do lactente pode causar perturbações no seu metabolismo. Há evidências científicas de que o ETOH altera o metabolismo intermediário dos carboidratos, lipídeos e proteínas (HALSTED, 1997). Quando comparados em períodos de gestação/lactação, observa-se retardo no abrir de olhos naqueles submetidos à exposição alcoólica nos dois períodos, além da redução na

formação da mielina cerebral, redução no peso do cérebro e de órgãos se mostrar mais severos na lactação e o atraso de crescimento corporal ser mais significativo na gestação (LANCASTER et al., 1984).

Assim como em nossos resultados, Fuentes e colaboradores (2001), também não encontraram diferenças significativas relacionadas ao peso corporal no dia do desmame em animais expostos ao ETOH exclusivamente no período pré-natal, em nosso caso, grupo EtG. Eles salientam que esta diferença pode estar associada ao fato de que a amamentação destes animais, ocorreu sem a presença de ETOH. Outra justificativa possível para tal fato pode ser encontrada no trabalho de Silva e colaboradores (2000), que afirmam que mães e/ou filhotes podem aumentar de peso a partir da abstinência. Isto ocorre porque no período de abstinência, mães e filhotes apresentam maior necessidade calórica, devido à supressão das calorias derivadas do ETOH; essa exigência induz a um aumento na procura e na ingestão de alimentos, assim como, a modificações na qualidade e quantidade do leite materno.

Nossos resultados relativos ao peso encefálico também mostram a influência do ETOH sobre este parâmetro, e assim como em relação ao peso corporal, os grupos que mostraram reduções significativas foram os que ingeriram ETOH durante a lactação ou gestação+lactação. Neste sentido é importante salientar que o cérebro se desenvolve rapidamente no final da gestação (terceiro trimestre), até cerca de 6 a 8 semanas após o nascimento, e pode ser vulnerável a exposição teratogênica. Em roedores este período compreende os primeiros 10 dias pós-natal, coincidentes com o período de aleitamento (KACHANI et al., 2008; ALFONSO-LOECHES; GUERRI, 2011). Em ratos recém-nascidos, alto grau de desenvolvimento cerebral e de mielinização ocorre nos primeiros quinze dias de vida; podendo haver redução de concentração na mielina, caso as lactantes recebam ETOH na dieta (LANCASTER et al., 1984); neste período, o peso cerebral aumenta mais rapidamente do que o peso corporal (OYAMA et al., 2000 b).

Tavares do Carmo e colaboradores (1999), ao avaliar os efeitos da exposição ao ETOH a 20% durante a lactação, encontraram além de reduções no peso corporal, diminuição do peso cerebral, na concentração de proteínas, e quantidade de DNA que foi associado a um menor número de células cerebrais nos filhotes expostos ao ETOH. Estes autores, também salientam que apesar do conteúdo de lipídios aumentarem no leite de ratos tratados com ETOH, compensando parcialmente a desnutrição induzida pelo ETOH ocorrida nos filhotes expostos a esta substância, permitindo adaptações metabólicas adequadas para prevenir hipoglicemia grave e manter reservas hepáticas mínimas de glicogênio, essas adaptações não

são suficientes para proteger contra o comprometimento do desenvolvimento cerebral, evidente nos filhotes expostos ao ETOH. Quanto às dosagens, apenas as proles expostas a maiores níveis de ETOH (20%) durante a lactação, apresentaram uma diminuição significativa no peso do cérebro, ou uma profunda redução no crescimento geral do corpo. A baixa dose (5%) não afetou o ganho de peso corporal dos filhotes ou seu peso no cérebro, sugerindo uma preservação do cérebro dos filhotes quando expostas a doses mais baixas (OYAMA et al., 2000b).

De modo geral, as análises apontam que a ingestão de ETOH a 15% causa perturbação severa ao desenvolvimento, seja corporal ou a nível de sistema nervoso central, para as proles expostas ao álcool durante o período pré ou pós-natal. Estudos apontam mecanismos celulares, que induzem a redução no número de neurônios serotoninérgicos, bem como a redução nos níveis de 5-HT em indivíduos expostos ao álcool durante o desenvolvimento, como disfunções no sistema imunológico, que também é afetado pela ingestão alcoólica na lactação, sendo observado déficit a longo prazo, na imunidade celular e no sistema nervoso, indicando sensibilidade ao ETOH em etapas precoces do desenvolvimento (HALSTED, 1996; VOLPI, 1998; MAHAN, 2000).

O ETOH pode ativar o sistema neuroimune inato, contribuindo para danos cerebrais e neurodegeneração em adultos e adolescentes (CREWS et al., 2015; MONTESINOS et al., 2016). Embora o papel da ativação do sistema neuroimune na patogênese da SAF tenha sido pouco abordado, tem sido demonstrado que a exposição ao ETOH durante o período neonatal provoca ativação microglial e a liberação de citocinas, sugerindo uma ativação da resposta imune (DREW; KANE, 2014; TOPPER et al., 2015), através da ativação de receptores imunes inatos, desencadeando vias de sinalização que culminam na produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, levando a neuroinflamação, alterações de mielina e dano neural (ALFONSO-LOECHES et al., 2010; 2012; CREWS et al., 2015; MONTESINOS et al., 2015; 2016).

O consumo voluntário de ETOH compulsivo durante a gestação e / ou períodos de lactação, induz a uma regulação positiva persistente das vias inflamatórias dependentes da ativação dos receptores TLR (receptores tipo Toll) em células gliais, levando a neurodegeneração e danos à mielina juntamente com disfunções comportamentais persistentes na prole, tais como déficits de memória, de trabalho espacial, e deficiências de coordenação motora (CANTACORPS et al., 2017). O papel crítico da ativação do TLR4 na liberação das citocinas corticais e quimiocinas induzidas pela exposição ao ETOH, podem estar associados

ao comprometimento do desenvolvimento cerebral e a disfunções de comportamento a longo prazo, desempenhando um papel importante nos defeitos do desenvolvimento neurológico da FASD (PASCUAL et al., 2017).

De modo geral, estes estudos sugerem que um dos mecanismos celulares que levam a neurodegeneração causada pelo ETOH é a ativação do sistema neuroimune, contribuindo para a redução de células neuronais, o que pode vir a ser uma das possíveis causas para a redução de células 5-HT+ observadas tanto no núcleo DR, quanto MnR da rafe dos grupos alcoólicos.

7. CONCLUSÕES

O consumo de etanol a 15%, por gestantes e/ou lactantes repercute negativamente sobre a prole, causando prejuízos para o desenvolvimento, com redução na imunorreatividade dos neurônios serotoninérgicos dos núcleos dorsal e mediano da rafe, além da perda de peso corporal e encefálico.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGHAJANIAN, G. K.; MAREK, G. J. Serotonin, via 5-HT_{2A} receptors, increases epscs in Layer V pyramidal cells of prefrontal cortex by an asynchronous mode of glutamate release. **Brain Res**, v.825, p.161–171. 1999.

AITKEN, A. R.; TORR, I. Early development of serotonin-containing neurons and pathways as seen in wholemount preparations of the fetal rat brain. **J. Comp. Neurol.** v. 274, p.32-47, 1988.

AKIL, H. A.; MORANO, M. I. In: BLOOM, F. E.; KUPFER, D. J. (Eds.) Psychopharmacology: the fourth generation of progress. **Raven**, p. 773-785, 1995.

ALFONSO-LOECHES, S; GUERRI, C. Molecular and behavioral aspects of the actions of alcohol on the adult and developing brain. **Crit. Rev. Clin. Lab. Sci**, v.48, p.19-47, 2011.

ALFONSO-LOECHES, S.; PASCUAL-LUCAS. M.; BLANCO, A. M.; SANCHEZ-VERA, I.; GUERRI, C. Pivotal role of TLR4 receptors in alcohol-induced neuroinflammation and brain damage. **J. Neurosci**, v. 30, p. 8285-8295, 2010.

ALFONSO-LOECHES, S.; PASCUAL, M.; GOMEZ-PINEDO, U.; PASCUAL-LUCAS, M., RENAU-PIQUERAS, J.; GUERRI, C. Toll-like receptor 4 participates in the myelin disruptions associated with chronic alcohol abuse. **Glia**, v.60, p. 948-964, 2012.

ALTMAN, J. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. **J. Comp. Neurol**, v. 137, p.433-457, 1969.

AMARANTE-MENDES, G. P.; GREEN, D. R. The regulation of apoptotic cell death. **Braz. J. Med. Biol.Res.** v.32, p.1053-1061, 1999.

AZMITIA, E. C.; YU, I.; AKBARI, H. M.; KHECK, N.; WHITAKER-AZMITIA, P. M. MARSHAK, D. R. Antipeptide antibodies against the 5-HT_{1A} receptor. **J. Chem. Neuroanat**, v.5, p.289–298, 1992.

AZMITIA, E. C.; GANNON, P. J. The ultrastructural localization of serotonin immunoreactivity in myelinated and unmyelinated axons within the medial forebrain bundle of rat and monkey. **J. Neurosci**, v. 3, p. 2083-2090, 1983.

AZMITIA, E. C.; GANNON, P. J.; KHECK, N. M.; WHITAKER-AZMITIA, P. M. Cellular localization of the 5-HT_{1A} receptor in primate brain neurons and glial cells. **Neuropsychopharm**, v.14, p.35-46. 1996.

AZMITIA, E. C.; SEGAL, M. An autoradiographic analysis of the differential ascending projections of the dorsal and median raphe nuclei in the rat. **J. Comp. Neurol**, v. 179, p.641-666, 1978.

BACKSTRAND, J. R.; GOODMAN, A. H.; ALLEN, L. H.; PELTO, G. H. Pulque intake during pregnancy and lactation in rural Mexico: alcohol and child growth from 1 to 57 months. **Eur. J. Clin. Nutr**, v.58, p.1626–1634, 2004.

BAKER, K. G.; HALLIDAY, G. M. Ascending noradrenergic and serotonergic system in the human brainstem. Neurotransmitters in the human brain. **Plenum. Press**, p. 155-171, 1995.

BARRY, J. A.; GAWRISH, K. Direct NMR evidence for ethanol binding to the lipid-water interface of phospholipid bilayers. **Biochemistry**, v.33, p. 8082-8088, 1994.

BAR-PELED, O.; GROSS-ISSEROFF, R.; BEN-HUR, H.; HOSKINS, I.; GRONER, Y.; BIEGON. Fetal human brain exhibits a prenatal peak in the density of serotonin 5-HT1A receptors. **Neurosci. Lett**, v.127,p.173–176. 1991a.

BAYER, S. A.; YACKEL, J. W.; PURI, P. S. Neurons in the rat dentate gyrus granular layer substantially increase during juvenile and adult life. **Science**, v. 216, p.890-892, 1982.

BEAR, M. F.; CONNORS, B. W.; PARADISO, M. A. Neurociências. Desvendando o sistema nervoso. 2.ed. 855p. Porto Alegre: **Artmed**, 2002.

BJARKAM, C. S.; SORENSEN, J. C.; GENESER, F. A. Distribution and morphology of serotonin-immunoreactive neurons in the brainstem of the New Zealand white rabbit. **J. Comp. Neurol.** v. 380, p. 507-519, 1997.

BOGDANSKI, D. F.; WEISSBACH, H.; UNDERFRIEND, S. The distribution of serotonin, 5-hydroxytryptophan decarboxylase, and monoamine oxidase in brain. **J. Neuroch**, v.1, p.272-278, 1957.

BOOKSTEIN, F. L.; STREISSGUTH, A. P.; SAMPSON, P. D.; CONNOR, P. D.; BARR, H. M. Corpus callosum shape and neuropsychological deficits in adult males with heavy fetal alcohol exposure. **Neuroimage**, v.15, p. 233-251, 2002.

BOSCO, C.; DIAZ, E. Placental hypoxia and foetal development versus alcohol exposure in pregnancy. **Alcoh. Alcoh.**, v.47, p.109-117, 2012.

BOSWELL, C. A.; MAJNO, G.; JORIS, I.; OSTROM, K. A. Acute endothelial cell contraction in vitro: A comparison with vascular smooth muscle cells and fibroblasts. **Microvasc. Res.** v.43, p.178–191, 1992.

BRASILIANO, S.; HOCHGRAF, P. B.; Drogadição feminina: a experiência de um percurso. In: Drogas, dependência e sociedade. p. 95-289. São Paulo: **Atheneu**, 2005.

BRODIE, B.; SHORE, P. A. concept for a role of serotonin and norepinephrine as chemical mediators in the brain. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 66, p. 631-642, 1957.

BRODY, T. Alcohol, In: Nutritional biochemistry. 9.ed., cap.4. p. 201-220. London: **Academic Press**, 1998.

BUCHER, B. Alcoolismo feminino e gestação: Prazer e deficiência andam juntos. **Rev. Conex. Eletr.**, v.12, p. 1-13, 2015.

BURD, L. Fetal alcohol spectrum disorders. São Paulo: Conference at the 1st **ABRAMD Congress**, 2008.

BURD, L.; ROBERTS, D.; OLSON, M.; ODENDAAL, H. Ethanol and the placenta: a review. **J. Mat-Fetal. Neon. Med.**, v. 20, p.361-375, 2007.

BURGOS, M. G. P. A.; BION, F. M.; CAMPOS, F. A. C. S.; WANDERLEY, L. G. Efeitos de bebidas alcoólicas no metabolismo e nutrição de ratos lactentes recém-nascidos. v.49, p.50-55. *Fac. Med. Univ. Fed. PE*. Recife, 2004.

CANTACORPS, et al. Maternal alcohol binge drinking induces persistente neuroinflammation associated with myelin damage and behavioural dysfunctions in offspring mice. **Neuropharma**, v.123, p. 368-384, 2017.

CESCONETTO, P. A. Alterações neuroquímicas induzidas pela exposição materna ao etanol durante os períodos gestacional e lactacional sobre hipocampo da prole. Dissertação de mestrado. **Univ. Fed. SC**, Programa de Pós-graduação em Farmácia, 130p, 2015.

CHAVES, R. G.; LAMOUNIER, J. A. Uso de medicamentos durante a lactação. **J. Pediatr.**, v. 60, p. 89-98, 2004.

CHEEMA, Z. F.; WEST, J. R.; MIRANDA, R. C. Ethanol induces FAS/APO (apoptosis-1 mRNA and cell suicide in the developing cerebral cortex. **Alco. Clin. Exp. Res.**, v. 24, p. 535-43. 2000.

CHESLOCK, S. J.; VARLINSKAYA, E. I.; SILVERI, M. M.; PETROV, E. S.; SPEAR, L. P.; SPEAR, N. E.; Acute effects of ethanol and the first suckling episode in the newborn rat. **Alcohol. Clin Exp Res**, v.24, p.996-1002, 2000.

CISA (Centro de Informações Sobre Saúde e Álcool). Consumo de álcool e a saúde da mulher. disponível em: <http://www.cisa.org.br/artigo/5187/consumo-alcool-saude-mulher.php>. Acesso em: janeiro de 2018.

CISA (Centro de Informações Sobre Saude e Álcool). Problemas sociais decorrentes do uso do álcool. disponível em: <http://www.cisa.org.br/artigo/221/problemas-sociais-decorrentes-uso-alcool.php>. Acesso em: fevereiro de 2018.

CLARREN, S. K.; ASTLEY, S. J.; GUNDERSON, V. M.; SPELLMAN, D. Cognitive and behavioral deficits in nonhuman primates associated with very early embryonic binge exposures to ethanol. **J. Pediatr.**, v.121, p.789-796, 1992.

CLAUSTRE, Y.; ROUQUIER, L.; SCATTON, B. Pharmacological characterization of serotonin-stimulated phosphoinositide turnover in brain regions of the immature rat. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v.244, p.1051-1056, 1988.

CLIMENT, E.; PASCUAL, M.; RENAU, J. P.; GUERRI, C. Ethanol exposure enhances cell death in the developing serie cortex: role of brain-derived neurotrophic factor and its sign pathways. **J. Neuro. Reseh**, v. 68, p. 213-225, 2002.

CLINE, H.; HAAS, K. The regulation of dendritic arbor development and plasticity by glutamatergic synaptic input: a review of the synaptotrophic hypothesis. **J. Physiol**, v.586, 1509–1517, 2008.

COMASCO, E.; RANGMAR, J.; ERIKSSON, U. J.; ORELAND, L. Neurological and neuropsychological effects of low and moderate prenatal alcohol exposure. **Acta Physiol**, v. 222, p.1-18, 2017.

CREWS, F.T., SARKAR, D. K., QIN, L., ZOU, J., BOYADJIEVA, N., VETRENO, R. P. Neuroimmune function and the consequences of alcohol exposure. **Alcoh. Res**, v.37, p. 331-51, 2015.

DAHLSTROM, A; FUXE, K. Evidence of the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system. I. Demonstration of monoamines in the cell bodies of brain stem neurons. **Acta. Physiol. Scand**, v. 62, n. 232, p.1-55, 1964.

DAY, N. L.; ROBLES, N.; RICHARDSON, G.; GEVA, D.; TAYLOR, P.; SCHER, M. The effects of prenatal alcohol use on the growth of children at three years of age. **Alcoh. Clin. Exp. Res**, v.15, p.67-71, 1991.

DAVAL, G.;VERGE, D.; BECERRIL, A.; GOZLAN, H.; SPAMPINATO, U.; HAMON, M. Transient expression of 5-HT1A receptor binding sites in some areas of the rat CNS during postnatal development. **Int. J. Dev. Neurosci**, v.5,p.171–180, 1987.

DERIÓ, T.C.J. et al. Neonatal exposure to citalopram, a serotonin selective reuptake inhibitor, programs a delay in the reflex ontogeny in rats. **Arqu. Neuropsiq**, v. 66, p. 736-740, 2008.

DETERING, N.; REED, W. D.; OZAND, P. T.; KARAHASAN, A. The effects of maternal ethanol consumption in the rat on the development of their offspring. **J. Nutr**, v.109, p. 999-1009, 1979.

DIAMOND, I.; GORDON, A. Celular and molecular neuroscience of alcoholism. **Physiol. Rev**, v.77, p.1-20, 1997.

DIAZ-GRANADOS, J. L.; SPUHLER-PHILLIPS, K.; LILLIQUIST, M. W.; AMSEL, A.; LESLIE, S. W. Effects of prenatal and early postnatal ethanol exposure on [3H] MK-801 binding in rat cortex and hippocampus. **Alcoh. Clin. Exp. Res**, v. 21, p.874-881, 1997.

DICKINSON, R.; FRANKS, N. P.; LIEB, W. R. Thermodynamics of anesthetic/protein interation. Temperature studies on firefly luciferase. **Biophys. J**, v. 64, p. 1254-1271, 1993.

DYCK, R. H.; CYNADER, M. S. Autoradiographic localization of serotonin receptor subtypes in cat visual cortex: Transient regional, laminar, and columnar distributions during postnatal development. **J. Neurosci**, v.13, p.4316–4338, 1993a.

DOBBING, J. Vulnerable periods in developing brain. In: DAVIDSON, A. N.; DOBBING, J. (ed.) **Apl. Neurochemmistry**, p.287-316, 1968.

DREW, P. D.; KANE, C. J.M. Fetal alcohol spectrum disorders and neuroimmune changes. **Int. Rev. Neurobiol**, v. 118, p. 41-80, 2014.

DRUSE, M. J. Effects of in utero ethanol exposure on the development of neurotransmitter systems. **Dev. Cent. Nerv. Syst.**p.139–167, 1992.

DRUSE, M. J.; TAJUDDIN, N. F.; GILLESPIE, R. A.;DICKSON, E.; ATIEH, M.; PIETRZAK, C. A.; LE, P. T. The serotonin-1A agonist ipsapirone prevents ethanol-associated death of total rhombencephalic neurons and prevents the reduction of fetal serotonin neurons. **Brain. Res. Dev. Brain. Res**, v.150, p. 79–88, 2004.

DRUSE, M. J.; TAJUDDIN, N. F.; GILLESPIE, R. A.; LE, P. T. Signaling pathways involved with serotonin1A agonistmediated neuroprotection against etanol induced apoptosis of fetal rhombencephalic neurons. **Brain. Res. Dev. Brain. Res**, v. 159, p.18-28, 2005.

DUMAS, A.; TOUTAIN, S.; SIMMAT-DURAND, L. Alcohol Use During Pregnancy or Breastfeeding: A National Survey in France. **J. women's. health**, v. 26, p.798-805, 2017.

ECKARDT, M.; MARTIN, P. R. Clinical assessment of cognition in alcoholism. **Alcoh. Clin. Exp. Res.** v.10, p. 123-127, 1986.

EVARD, S. G. et al. A low chronic ethanol exposure induces morphological changes in the adolescent rat brain that are not fullyrecovered even after a long abstinence: An immunohistochemical study. **Exp. Neurol**, v. 200, p. 438-459, 2006.

EVARD, S. G.; VEGA, M. D.; RAMOS, A. J.; TAGLIAFERRO, P.; BRUSCO, A. Altered neuron-glia interactions in a low, chronic prenatal ethanol exposure. **Brain. Res. Dev. Brain. Res**, v. 147, p.119-133, 2003.

FADA, F.; ROSSETTI, Z. L. Chronic ethanol consumption: from neuroadaptation to neurodegeneration. **Prog. Neurobiol**, v.56, p. 385-431, 1998.

FALCK, B. et al. Fluorescence of catecholamines and related compounds condensed with formaldehyde. **J. Histochem. Cytochem**, v. 10, p. 348-354, 1962.

FARBER, N. B.; CREELEY, C. E.; OLNEY, J. W. Alcohol-induced neuroapoptosis in the fetal macaque brain. **Neurobiol. Dis**, v. 40, p. 200-206, 2010.

FEIJÓ, F. M. et al. Serotonina e controle hipotalâmico da fome: uma revisão. **Rev. Ass. Méd. Bra**, v. 57, p.74-77, 2011.

FITE, K.V. et al. Retinal afferents to the dorsal raphe nucleus in rats and mongolian gerbils. **J. Comp. Neurol**, v. 414, p. 469-484, 1999.

FELTEN, D. L.; SLADEK, J. R. Monoamine distribution in primate brain. V. Monoamine distribution in primate brain. V. Monoaminergic nuclei: anatomy, pathways and local organization. **Brain Res. Bull.** v. 10, p.171-284, 1983.

FERREIRA, T. A. A.; FERREIRA, N. R.; MORAIS, J. O. R.; PENHA-SILVA, N. Effects of acute prenatal exposure to ethanol on the postnatal morphology of the prefrontal cortex in wistar rats. **Braz. J. morphol. Sci.** v. 21, p. 99-103, 2004.

FITE, K. V. et al. Retinal afferents to the dorsal raphe nucleus in rats and mongolian gerbils. **J. Comp. Neurol.** v. 414, p. 469-484, 1999.

FLAK, A. L.; SU S.; BERTRAND, J.; DENNY, C. H.; KESMODEL, U. S.; COGSWELL, M.E. The association of mild, moderate, and binge prenatal alcohol exposure and child neuropsychological outcomes: a meta-analysis. **Alcoh. Clin. Exp. Res.** v.38, p.214-26, 2014.

FRAZÃO, R. et al. Evidence of reciprocal connections between the dorsal nucleus ad retina in the monkey Cebus paella. **Neurosci. Lett.** v.430, p.119-123, 2008.

FREDERICK, A. L., STANWOOD, G. D. Drugs, biogenic amine targets and the developing brain. **Dev. Neurosci.** v. 31, p.7-22, 2009.

FREUND, G. Chronic central nervous system toxicity of alcohol. **Rev. Pharmac.** v.13, p. 217-227, 1973.

FUENTES, L. M.; ARTILLO, R.; CARRERAS, O.; MURILLO, L. Effects of maternal chronic alcohol administration in the rat: lactation performance and pup's growth. **Eur. J. Nutr.** v. 40, p.147-154, 2001.

FUJITA, S.; SHIMADA, M.; NAKAMURA, T. H3-Thymidine autoradiographics studies on the cell proliferation and differentiation in the external and internal granular layers of the mouse cerebellum. **J. Com. Neurol.** v.128, p.191-208, 1966.

FUNDO DE POPULAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS-UNFPA. Quase metade das gestações no Brasil não é planejada, destaca Fundo de População da ONU. Disponível em: <https://nacoesunidas.org/quase-metade-das-gestacoes-no-brasil-nao-e-planejada-destaca-fundo-de-populacao-da-onu/>. Acesso em dezembro de 2017.

GASPAR, P.; CASES, O.; MAROTEAUX, L. The developmental role of serotonin: news from mouse molecular genetics. **Nat. Rev. Neurosci.** v.4, p.1002–1012, 2003.

GARCIA, R.; ROSSI, N. F.; GIACHETI, C. M. Perfil de habilidades de comunicação de dois irmãos com a síndrome alcoólica fetal. **Ver. CEFAC.** v.9, p. 461-468, 2007.

GADDUM, J. H; PICARELLI, Z. P. Two kinds of tryptamine receptor. **Br J. Pharmacol.** v. 12, p. 323-328, 1957.

GILBERT, S. G. A small dose of alcohol. 2011. Disponível em: <http://toxipedia.org/display/dose/Alcohol>. Acesso em: Fevereiro de 2018.

GOODLETT, C. R.; HORN, K. H. Mechanisms of alcohol-induced damage to the developing nervous system. **Alcoh. Res. Health**, v.25, p.175-184, 2001.

GOODLETT, C.; HORN, K.; ZHOU.; F. Alcohol teratogenesis: Mechanisms of damage and strategies for intervention. **Exp. Biol. Med**, v.230, p.394-406, 2005.

GOODLETT, C. R.; LILLER, M. W.; HOFFMAN, P. Mechanisms of ethanol induced neuronal death during development: from molecular to behavior. **Alcoh. Clin. Exp. Res**, v.20, p.128-132, 1996.

GRINFELD, H. Alcoolismo feminino durante a gestação. In: SEGRE, C.A.M. Efeitos do álcool na gestante, no feto, no recém-nascido. V. 1, p. 19-37. **Soci. Pediatr. SP**, 2010.

GRINFELD, H. Consumo nocivo de álcool durante a gravidez. 2005. Disponível em: <http://www.cisa.org.br/UserFiles/File/alcoolesuasconsequencias-pt-cap9.pdf>. Acesso em: 26 Agosto .2016.

GUEDES, R. C. A.; BEZERRA, R. S.; ABADIE-GUEDES, R. Ethanol and Its Impact on the Brain's Electrical Activity. Cap,41. p.1-9, In: Neuropathology of Drug Addictions and Substance Misuse, v.1. p.445-453. **Els. Acad.Press**. 2016.

GUEDES, R. C. A. O Cérebro desnutrido. **Ciência Hoje**, v.3, p. 61-65, 1985.

GUERRI, C. Neuroanatomical and neurophysiological mechanisms involved in central nervous system dysfunctions induced by prenatal alcohol exposure. **Alcoh. Clin. Exp. Res**, v.22, p. 304 -312, 1998.

GUERRI, C.; BAZINET, A.; RILEY, E. P., Foetal alcohol spectrum disorders and alterations in brain and behaviour. **Alcohol**, v 44, p.108-114, 2009.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E.: Tradução de Barbara de Alencar Martins et al. Tratado de Fisiologia Médica. 11. ed. Rio de Janeiro: **Elsevier**, 2006. 4ª tiragem

HAASTRUP, M. B.; POTTEGARD, A.; DAMKIER, P. Alcohol and Breastfeeding. **Send to Basic. Clin. Pharmacol. Toxicol**, v.114, p. 168–173, 2014.

HALBACH, O. V. B. U.; DERMIETZEL, R. Neurotransmitters. In:_____. Neurotransmitters and Neuromodulators. **Weinheim: Wiley-VHC**, cap. 3, p. 132-143a. 2006a.

HALBACH, O.V. B. U; DERMIETZEL, R. Serotonin (5-hydroxytryptamine). In:_____. Neurotransmitters and neuromodulators: handbook of receptors and biological effects. **Weinheim: Wiley-VCH**. p. 132-142, 2006b.

HALBERSTADT, A. L.; BALABAN, C. D. Organization of projections from the raphe nuclei to the vestibular nuclei in rats. **Neuroscience**, v.120, p.573–594. 2003.

- HALBERSTADT, A. L., BALABAN, C. D. Serotonergic and nonserotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus send collateralized projections to both the vestibular nuclei and the central amygdaloid nucleus. **Neuroscience**, v.140, p.1067–1077.2006a.
- HALBERSTADT, A. L.; BALABAN, C. D. Anterograde tracing of projections from the dorsal raphe nucleus to the vestibular nuclei. **Neuroscience**, v.143, p.641–654. 2006b.
- HALE, T.W. Drug therapy and breastfeeding: pharmacokinetics, risk factors and effects on milk production. **Neoreviews**, v.5, p.164. 2004.
- HALSTED, C. H. Ethanol feeding of micropigs increased methionine metabolism and proliferation. **Hepatology**, v.23. p.497-505, 1996.
- HAMON, M.; BOURGOIN, S. Ontogenesis of tryptophan transport in the rat brain. **J. Neural Transm. Suppl.** p. 93-105, 1979.
- HEDNER, J.; LUNDELL, K. H.; BREESE, G. R.; MUELLER, R. A.; HEDNER, T. Developmental Variations in CSF Monoamine Metabolites during Childhood. **Biol. Neonate**, v.49,p.190-197, 1986.
- HILLION, J.; MILNE-EDWARDS, J. B.; CATELON, J.; DE VITRY, F.; GROS, F.; HAMON, M. Prenatal developmental expression of rat brain 5-HT1A receptor gene followed by PCR. **Biochem. Biophys. Res. Commun**, v.191, p.991–997. 1993.
- HOYER, D. et al. International union of pharmacological classification of receptor for 5-hydroxytryptamine (serotonin). **Pharmacol. Rev.** v. 46, p. 157-193, 1994.
- HOYME, H. E.; MAY, P. A.; KALBERG, W. O.; KODITUWAKKU, P.; GOSSAGE, J. P.; TRUJILLO, P. M. A practical clinical approach to diagnosis of fetal alcohol spectrum disorders: clarification of the 1996 Institute of Medicine Criteria. **Pediatrics**, v. 115, p. 39-47, 2005.
- HOYME, H. E. et al. Updated Clinical Guidelines for Diagnosing Fetal Alcohol Spectrum Disorders, **Pediatrics**, v.138, p.2015-4256, 2016.
- HUTTENLOCHER, P. R.; DABHOLKAR, A. S. Regional differences in synaptogenesis in human cerebral cortex. **J.Comp.Neurol**, V.387, P.167-78, 1997.
- HUTTENLOCHE, R; DABHOLK,A.R, HEIL S.H, HUNGUND, B.L, ZHENG, Z. H. H, JEN, K. L. C, SUBRAMANIAN, M. G. Ethanol and lactation: effects on milk lipids and serum constituents. **Alcohol**, v18, p.43-8. 1999.
- IDRUS, N. M.; THOMAS, J. D. Fetal alcohol spectrum disorders: Experimental treatments and strategies for intervention. **Alcoh. Res. Heal**, v.34, p.76–85, 2011.
- IKONOMIDOU, C. et al. Ethanol-induced apoptotic neurodegeneration and fetal alcohol syndrome. **Science**, v. 287, p.1056–1060, 2000.

IKONOMIDOU, C. et al. Neurotransmitters and apoptosis in developing brain. **Biochem. Pharmacol**, v.62, p.401-405, 2001.

JACOBS, B. L.; AZMITIA, E. C. Structure and function of the brain serotonin system. **Physiol. Rev**, v.72, p. 165-229, 1992.

JACOBS, B. L.; GANNON, P. J.; AZMITIA, E. C. Atlas serotonergic cell bodies in the cat brainstem: an immunocytochemical analysis. **Brain Res. Bull.** v. 13, p.1-31, 1984.

JANVALE, G.; KENDRE, S.; MEHROTA, S. Mental and behavioural disorders related to alcohol and their effects on EEG signals – An overview. **Proced- Soc. Behav. Sci**, v. 133, p. 116-121, 2014.

JONES, K. L.; SMITH, D. W. Recognition of the fetal alcohol syndrome in early infancy. **Lancet**, v. 302, n.7836, p999–1001, 1973.

KACHANI, A. T. et al. Aleitamento Materno: quanto o álcool pode influenciar na saúde do bebê? **Rev. Pedia. USP**, São Paulo, v. 30, n. 4, p. 249-256, 2008.

KAUP, Z. O. L.; MERIGHI, M.A.B.; TSUNECHIRO, M.A.; Avaliação do Consumo de Bebida Alcoólica Durante a Gravidez. **RBGO**, v. 23, p.575-580, 2001.

KELLY, S. J.; MAHONEY, J. C.; WEST, J. R. Changes in brain microvasculature resulting from early postnatal alcohol exposure. **Alcohol**, v.7, p. 43-47, 1990.

KENT, O. L.; SALDEK, J. R. Histochemical, pharmacological and microspectrofluorometric analysis of new sites of serotonin localization in the rat hypothalamus. **J. Comp. Neurol**, v. 180, p. 221-236, 1978.

KOREN, G. et al.; Estimation of fetal exposure to drugs of abuse, environmental tobacco, smoke, and ethanol, **Ther. Drug Monit**, v.24, p.23-25, 2002.

LALITHA, T.; KUMAR, K.; RAMAKRISHNAN, C. V.; TELAND, S. D. Effect of maternal alcohol consumption on the lipid composition of CNS in the offspring. **J.Neurochem**, v.50, p.1346-1351. 1988.

LAMBERT, H. W.; LAUDER, J. M. Serotonin receptor agonists that increase cyclic AMP positively regulate IGF-I in mouse mandibular mesenchymal cells. **Dev. Neurosci**, v .21, p. 105–112, 1999.

LANCASTER, F. E.; PHILLIPS, S. M.; PATSALOS, P. N.; WIGGINS, R. C. Brain myelination in the offspring of ethanol-treated rats: in utero versus lactational exposure by crossfostering offspring of control, pairfed and ethanol treated dams. **Brain. Res**, v.309, p.209-16, 1984.

LARANJEIRA, R. (Org.). II Levantamento Nacional de Álcool e Drogas (LENAD). Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Políticas Públicas de Álcool e Outras Drogas (INPAD), **UNIFESP**. vv.2, p.1-85, 2014.

LAUDER, J. M.; BLOOM, F. E. Ontogeny of monoamine neurons in the locus coeruleus, raphe nuclei and substantia nigra of the rat. II. Synaptogenesis. **J. Comp. Neurol.**, v.163, p.251–264, 1975.

LAUDER, J. M.; KREBS, H. Serotonin as a differentiation signal in early neurogenesis. **Dev. Neurosci.**, v.1, p.15–30. 1978.

LAUDER, J. M. Ontogeny of neurotransmitter systems: Substrates for developmental disabilities? **Ment. Retard. Dev. Disabil. Res.**, v.1, p. 151–168, 1995.

LAUDER, J. M.; LIU, J.; GRAYSON, D. R. In utero exposure to serotonergic drugs alters neonatal expression of 5-HT(1A) receptor transcripts: A quantitative RT-PCR study. **Int. J. Dev. Neurosci.**, v.18, p.171–176, 2000.

LAUDER, J. M.; TOWLE, A. C.; PATRICK, K.; HENDERSON, P.; KREBS, H. Decreased serotonin content of embryonic raphe neurons following maternal administration of p-chlorophenylalanine: A quantitative immunocytochemical study. **Brain. Res.**, v. 352, p.107–114.1985.

LEMOINE, P; HAROUSSEAU H.; BORTEYRU, J. P; MENUET, J. C. Les enfants de parents alcooliques. Anomalies observées. A propos de 127 cas. **Ouest-Medical**, v. 21, p. 477-482, 1968.

LEVALLOIS, C., VALENCE, C., BALDET, P., AND PRIVAT, A. Morphological and morphometric analysis of serotonin-containing neurons in primary dissociated cultures of human rhombencephalon: A study of development. **Brain. Res. Dev. Brain Res.**, v.99, 243–252, 1997.

LIDOV, H. G.; MOLLIVER, M. E. Immunohistochemical study of the development of serotonergic neurons in the rat CNS. **Brain. Res. Bull.**, v.9, p.559–604. 1982.

LO, C. L.; ZHOU, F. C. Environmental alterations of epigenetics prior to the birth. **Int. Rev. Neurobiol.**, v.115, p.1-49, 2014.

LOHMANN, C., KESSELS, H. W. The developmental stages of synaptic plasticity. **J. Physiol. (Lond)**, v.592,p. 13–31, 2014.

LOIS, C.; ALVAREZ-BUYLLA, A. Long distance neuronal migration in the adult mammalian brain. **Science**, v.264, p. 1145-11458. 1994.

LOPES, A. P. A. T.; GANASSIN, G. S.; MARCON S. S.; DECESARO, M. N. Abuso de bebida alcoólica e sua relação no contexto familiar. **Estudos de Psicologia**, V. 20, p. 22-30, 2015.

MAHAN, K. L.; ESCOTT-STUMP, S.; KRAUSE: alimentos, nutrição e dietoterapia. 10ed. Rio de Janeiro: **Roca**, 2000.

- MARIN-PADILLA, M. Ontogenesis of the pyramidal cell of the mammalian neocortex and developmental cytoarchitectonics: a unifying theory. **J. Comp. Neurol**, v.321, p.223-240, 1992.
- MATTSON, S. N.; RILEY, E. P. A review of the neurobehavioral deficits in children with fetal alcohol syndrome or prenatal exposure to alcohol. **Alcoh. Clin. Exp. Res**, v. 22, p. 279-294, 1998.
- MATTSON, S. N.; SCHOENFELD, A. M.; RILEY, E; P. Teratogenic effects of alcohol on brain and behavior. **Alcoh. Res. Heal**, v.25, p. 91-185, 2011.
- MAYHAN, W. G.; DIDION, S. P. Effect of chronic alcohol consumption on responses of cerebral arterioles. **Alcoh. Clin. Exp. Res**, v. 20, p. 538-542, 1996.
- MENNELLA, J. A. Alcohol's effect on lactation. **Alcoh. Res.Heal**, v.25, p.230-234. 2001a.
- MENNELLA, J. A; BEAUCHAMP, G. K. Maternal diet alters the sensory qualities of human milk and the nursling's behavior. **Pediatrics**, v.88, p.737-744, 1991.
- MENNELLA, J. A.; BEAUCHAMP, G. K. The effects of repeated exposure to garlic-flavored milk on the nursling's behavior. **Pediatr. Res. Dec**, v.34,p.805-808. 1993.
- MENNELLA, J. A.; GERRISH, C. J. Effects of exposure to alcohol in mother's milk on infant sleep. **Pediatrics**, v.101, p.21-25, 1998.
- MENNELLA, J. A.; PEPINO, M. Y. Biphasic effects of moderate drinking on prolactin during lactation. **Alcoh. Clin. Exp. Res**, v.32, p.899-908, 2008.
- MENELLA, J. A.; PEPINO, M. Y.; TEF, K. L. Acute alcohol consumption disrupts the hormonal milieu of lactating women. **J. Clin. Endocrinol. Metab**, v. 90, p.1979-1985, 2005.
- MENNELLA, J. A. Regulation of milk intake after exposure to alcohol in mothers'milk. **Alcoh. Clin. Exp. Res**.v.25, p.590-593. 2001b.
- MELLO, M. L. M.; BARRIAS, J.; BREDA, J. Álcool e problemas ligados ao álcool em Portugal. Lisboa, **Direção Geral de Saúde**. 2011.
- MEYERS, S. Use of Neurotransmitter Precursors for Treatment of Depression. **Rev. Alternat. Medic**, v. 5, p. 64-71, 2000.
- MICHAELIS, E. K.; FREED, W. J.; GALTON, N.; FOYE, J.; MICHAELIS, M. L.; PHILLIPS, I.; KLEINMAN, J. E. Glutamate receptor changes in brain synaptic membranes from human alcoholics. **Neurochem. Res**, v. 15, p. 1055-1063, 1990.
- MIGLIARINI, S., PACINI, G., PELOSI, B., LUNARDI, G., PASQUALETTI, M. Lack of brain serotonin affects postnatal development and serotonergic neuronal circuitry formation. **Mol. Psychiatry**, v.18, p.1106–1118, 2013.

MILLER, M. W. Migration of cortical neurons is altered by gestational exposure to ethanol. **Alcoh. Clin. Exp. Res.**, v.17, p.304-314, 1993.

MINANA, R.; CLIMENT, E.; BARETTINO, D.; SEGUI, J. M.; RENAU-PIQUERAS, J.; GUERRI, C. Alcohol exposure alters the expression pattern of neural cell adhesion molecules during brain development. **J. Neurochem**, v.75, p.954-64, 2000.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, SECRETARIA DE POLÍTICAS DE SAÚDE, Área Técnica de Saúde da Criança. Amamentação e uso de drogas. Brasília: **Ministério da Saúde**; 2010.

MOHAJERANI, M. H.; CHERUBINI, E. Role of giant depolarizing potentials in shaping synaptic currents in the developing hippocampus. **Crit. Rev. Neurobiol**, v.18, p.13–23, 2006.

MOISEWITSCH, J. R.; RAYMOND, J. R.; TAMIR, H.; LAUDER, J. M. Regulation by serotonin of tooth-germ morphogenesis and gene expression in mouse mandibular explant cultures. **Arch. Oral Biol**, v. 43, p.789-800, 1998.

MOMINO, W.; SANSEVERINO, M. T. V.; SCHULER-FACCINI, L. Prenatal alcohol exposure as a risk factor for dysfunctional behaviors: the role of the pediatrician. **J. Pediatr**, v.84, p.76-79, 2008.

MONSHEEL, S. K.; SANDERS-BUSH, E. Serotonin and brain development. **Int. Rev. Neurobiol**, v.59, p.111-174, 2004.

MONTEIRO, M. G. Alcohol research in Latin America. **Alcoholism: Clin. Exp. Res.**, v. 20, p. 80-176, 1996.

MONTESINOS, J.; ALFONSO-LOECHES, S.; GUERRI, C. Impact of the innate immune response in the actions of ethanol on the central nervous system. **Alcoh. Clin. Exp. Res.**, v.40, p.2260-2270, 2016.

MONTESINOS, J.; PASCUAL, M.; PLA, A.; MALDONADO, C.; RODRÍGUEZ-ARIAS, M.; MINARRO, J.; GUERRI, C. TLR4 elimination prevents synaptic and myelin alterations and long-term cognitive dysfunctions in adolescent mice with intermittent ethanol treatment. **Brain. Behav. Immun**, v.45, p.233e-244. 2015.

MOORE, R. Y. et al. Serotonin neurons of the midbrain raphe: ascending projections. **J. Comp. Neurol.** v. 180, p.417-438, 1978.

MORGANE, P. J.; AUSTIN-LAFRANCE, R.; BRONZINO, J.; TONKISS, J.; DÍAS-CINTRA, S.; CINTRA, L.; KEMPER, T.; GALLER, J. R. Prenatal malnutrition and development of the brain. **Neurosci. Biobeh. Revie**, v.17, p.91-128, 1993.

MORGANE, O. J.; MOKLER, D. J.; GALLER, J. R. Effects of prenatal protein malnutrition on hippocampal formation. **Neurosc. Biobehav. Rev**, v.26, p.471-483, 2002.

MOST, D.; FERGUSON, L.; HARRIS, R. A. Molecular basis of alcoholism. **Handb. Clin. Neurol**, v.125, p.89-111, 2014.

MURAWSKI, N. J.; MOORE, E. M.; THOMAS, J. D.; RILEY, E. P. Advances in Diagnosis and treatment of fetal alcohol spectrum disorders: from animal models to human studies. **Alcoh. Res**, v.37, p.97-108, 2015.

NEBIGIL, C.G.; CHOI, D.S.; DIERICH, A.; HICKEL, P. L. E.; MEUR, M.; MESSADDEQ, N.; LAUNAY, J. M.; MAROTEAUX, L. Serotonin 2B receptor is required for heart development. **Proc. Natl. Acad. Sci**, v.97, p.9508-13, 2000.

NICCOLS, A. Fetal alcohol syndrome and the developing socio-emotional brain. **Brain. Cogn**, v.65, p.135-42, 2007.

NIXON, K.; CREWS, F.T. Binge ethanol exposure decreases neurogenesis in adult rat hippocampus. **J. Neurochem**, v. 83, p.1087-1093, 2002.

NOGUEIRA, M. I. et al. Afferent connections of the caudal raphe pallidus nucleus in rats: a study using the fluorescent retrograde tracers fluorogold and true-blue. **Ann. Ant.** v. 181, p. 35-45, 1999.

O'STEEN, W. K.; JAMES, L.; BARNARD, J.; ROBERT, D. Morphologic changes in skeletal muscle induced by serotonin treatment: A light- and electron-microscope study. **Exp. Mol. Pathol**, v.7, p.145-155, 1967.

ORNOY, A. L.; ERGAZ, Z. Alcohol abuse in pregnant women: effects on the fetus and newborn, mode of action and maternal treatment. **Int. J. Env. Res. Pub. Heal**, v.7, p.364-379, 2010.

OTHMAN, T.; LEGARE, D.; SADRI, P.; WAYNE, W.; PARKINSON, F. E. A preliminary investigation of the effects of maternal ethanol intake during gestation and lactation on brain adenosine A1 receptor expression. In rat offspring. **Neurotoxicol. Teratol**, v. 24, p.275-279. 2002.

OYAMA, L. M.; COUTO, R. C.; COUTO, G. E. C.; DAMASO, A. R.; NASCIMENTO, C. M. O. Ethanol intake during lactation II. Effects on pups' liver and brain metabolism. **Alcohol**, v.21, p. 201-206, 2000b.

PASCUAL. et al. TLR4 response mediates ethanol-induced neurodevelopment alterations in a model of fetal alcohol spectrum disorders. **J. Neuroinfla**, v.14, p.145. 2017

PAXINOS, G.; WATSON, C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 2^a Ed. **Academic Press**. San Diego. 2007.

PECHANCKY, F.; VON DIEMEN, L. MICHELI, D; AMARAL, M. B. Fatores de risco e proteção em diferentes grupos de usuários: adolescentes, idosos, mulheres e indígenas. In _____, O uso de substâncias psicoativas no Brasil: módulo 1. – 11. ed. – Brasília :**Secretaria Nacional de Políticas sobre Drogas**, 146 p. 2017.

PHILLIPS, D. E.; KRUEGER, S. K.; WALL, K. A.; SMOYER-DEARING, L. H.; SIKORA, A. K. The development of the blood-brain barrier in alcohol-exposed rats. **Alcohol**, v.14, p. 333-343, 1997.

PINATO, L. et al. A comparative study of cytoarchitecture and serotonergic afferents in the suprachiasmatic nucleus of primates (*Cebus apella* and *Callithrix jacchus*) and rats (Wistar and long Evans strains). **Brain. Res.** v. 1149, p. 101-110, 2007.

PINHEIRO, M. C. S.; OLIVEIRA FILHO. Síndrome Alcoólica Fetal: causas, diagnósticos e consequências. 22p. Trabalho de conclusão de Curso, Centro Universitário de Brasília – **UniCEUB**. 2015.

POPOVA, S.; LANGE, S.; PROBST, C.; GMEL, G.; REHM, J. Estimation of national, regional, and global prevalence of alcohol use during pregnancy and fetal alcohol syndrome: a systematic review and meta-analysis. **Articles**. Disponível em: www.thelancet.com/lancetgh. [http://dx.doi.org/10.1016/S2214-109X\(17\)30021-9](http://dx.doi.org/10.1016/S2214-109X(17)30021-9). 2017. Acesso em novembro 2018.

RAKIC, P. Principles of neural cell migration. **Experientia**, v.46, p.882-891, 1990.

RAMÓN Y CAJAL, S. Histologie du systeme Nerveux d l'Homme et des vertebres II, **Malone**, Paris. 1911.

RANGMAR, J.; SANDBERG, A. D.; ARONSON, M.; FAHLKE, C. Cognitive and executive functions, social cognition and sense of coherence in adults with fetal alcohol syndrome. **Nord. J. Psychiatry**, v.69, p.472–478, 2015b.

RANGMAR, J.; HJERN, A.; VINNERLJUNG, B.; STROMLAND, K.; ARONSON, M.; FAHLKE, C. Psychosocial outcomes of fetal alcohol syndrome in adulthood. **Pediatrics**, v.135, p. 52-58, 2015a.

RAPPTOR, M. et al. Serum vasoconstrictor IV. Isolation and characterization. **J. Biol. Chem**, v. 176, p. 1244-1251. 1948.

RHEM, J. The risks associated with alcohol use and alcoholism. **Alcoh. Res. Heal.** v. 34, p. 135-143, 2011.

RIBEIRO, E. M.; GONZALES, C. H. Síndrome Alcoólica fetal: Revisão. **Pediatrics**, v. 17, p. 48-56, 1995.

ROOD, B. D.; CALIZO, L. H.; PIEL, D.; SPANGLER, Z. P.; CAMPBELL, K.; BECK, S. G. Dorsal raphe serotonin neurons in mice: immature hyperexcitability transitions to adult state during first three postnatal weeks suggesting sensitive period for environmental perturbation. **J. Neurosci**, v.34, p.4809-4821, 2014.

ROOZEN, S.; PETERS, G. J.; KOK, G.; TOWNEND, D.; NIJHUIS, J.; CURFS, L. Worldwide prevalence of fetal alcohol spectrum disorders: a systematic literature review including meta-analysis. **Alcoh. Clin. Exp. Res**, v.40, p.18-32, 2016.

ROSENBERG, A. Brain damage caused by prenatal alcohol exposure. **Sci. Medicine**, v.4, p.42-50, 1996.

RUBENSTEIN, J. L. Development of serotonergic neurons and their projections. **Biol. Psychiatry**, v.44, p.145–150, 1998.

- SANDERS-BUSH, E.; BUSHING, J. A.; SULSER, F. p-chloroamphetamine: inhibition of cerebral tryptophan hydroxylase. **Biochem. Pharmacol**, v. 21, p. 1501–1510, 1972.
- SANDERS-BUSH, E., GALLAGER, D. A.; SULSER, F. On the mechanism of brain 5 hydroxytryptamine depletion by p-chloroamphetamine and related drugs and the specificity of their action. **Adv. Biochem. Psychopharmacol**, v.10, p.185–194. 1974.
- SARI, Y.; ZHOU, F. C. Prenatal alcohol exposure causes long-term serotonin neuron deficit in mice. **Alcoh. Clin. Exp. Res**, v.28, p.941–948. 2004.
- SCIVOLETTO, S.; MALBERGIER, A. Toxicologia Social e Medicamentos. In: OGA, S. Fundamentos de Toxicologia. 2. Ed. **Atheneu**, Cap.4, p.271-285. São Paulo: 2003.
- SHANKAR, K.; RONIS, M. J. J.; BADGER T. M. Effects of pregnancy and nutritional status on alcohol metabolism. **Alcoh. Res. Heal**, v. 30, p. 55-59, 2007.
- SHIBLEY, I. A.; MCINTYRE, T. A.; PENNINGTON, S. N. Experimental models used to measure direct and indirect ethanol teratogenicity. **Alcoh. Alcoholism**, v.34, p.125-140, 1999.
- SILVA, V. A.; SILVA, J. B.; GISMONDI, R. A. O.; REBELLO, G. P. Ethanol improves lactation outcome in malnourished rats. **Nutritional Neuroscience** v.3, p.277-282, 2000.
- SLIWOWSKA, J. H.; SONG, H. J.; BODNAR, T.; WEINBERG, J. Prenatal alcohol exposure results in long-term serotonin neuron deficits in female rats: modulatory role of ovarian steroids. **Alcoh. Clin. Exp. Res**, v.38, p.152–160, 2014.
- SOARES, J. G. et al. Nuclear organization of the serotonergic system in the brain of the rock cavy (*Kerodon rupestris*). **J. Chem. Neuroanat.** v. 43, p. 112-119, 2012.
- STEINBUSCH, H. W. M. Distribution of serotonin-immunoreactivity in the central nervous system of the rat cell bodies and terminals. **Neuroscience**. V. 3, P. 557-618, 1981.
- STREISSGUTH, A. P.; LANDESMAN-DWYER, S. L. Teratogenic effects of alcohol in humans and laboratory animals. **Science**, v. 209, p. 353-361, 1996.
- SVANIDZE, I. K.; DIDIMOVA, E. V.; TSAISHVILI, T. S. Proliferative activity of the matrix cells in the lateral ventricles and granule cells in the dentate gyrus of the hippocampus in the rats after pre and post-natal alcoholic intoxication. **IZv. Akad. Nauk. Ser. Biol**, v.9, p.117-120, 2001.
- SUBRAMANIAN, M. G. Effects of chronic alcohol administration on lactational performance in the rat. **Alcohol**, v.12, p.137-143, 1995.
- SUNDSTROM, E.; KOLARE, S.; SOUVERBIE, F.; SAMUELSSON, E. B.; PSCHERA, H.; LUNELL, N. O.; AND SEIGER, A. Neurochemical differentiation of human bulbospinal monoaminergic neurons during the first trimester. **Brain. Res. Dev. Brain. Res**, v.75, p.1–12, 1993.

- TABER, E.; BRODAL, A.; WALBERG, F. The raphe nuclei of the brain in the cat. I. Normal topography and cytoarchitecture and general discussion. **J. Comp. Neurol.** v. 114, p. 161-167, 1960.
- TAJUDDIN, N. F.; DRUSE, M. J. In utero ethanol exposure decreased the density of serotonin neurons. Maternal ipsapirone treatment exerted a protective effect. **Brain. Res. Dev. Brain. Res.** v.117, p.91-97. 1999.
- TARELO-ACUNA, L.; OLVERA-CORTES, E.; GONZALEZ-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. **Neurosci. Lett.** v. 286, p.13-16. 2000.
- TAVARES-DO-CARMO, M. G. T.; NASCIMENTO, C. M.; MARTIN, A.; HERRERA, E. Ethanol intake during lactation impairs milk production in rats and affects growth and metabolism of suckling pups. **Alcohol**, v.18, p.71-76, 1999.
- TESTINO, G.; BORRO, P. Alcohol and gastrointestinal oncology. **World. J. Gastroint. Oncology**, v.2, p. 322-332, 2010.
- TECOTT, L. H.; SUN, L. M.; AKANA, S. F.; STRACK, A. M., LOWENSTEIN, D. H.; DALLMAN, M. F.; AND JULIUS, D. Eating disorder and epilepsy in mice lacking 5-Ht_{2c} serotonin receptors. **Nature**, v. 374, p.542-546, 1995.
- TORK, I. Raphe nuclei serotonin containing systems. In: PAXINOS, G. (Eds.). The rat nervous systems. Sydney: **Acad. press.** p. 43-78, 1985.
- TORK, I. Anatomy of the serotonergic system. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* v. 600, p. 9-35, 1988.
- TOPPER, L. A.; BACULIS, B. C.; VALENZUELA, C. F. Exposure of neonatal rats to alcohol has differential effects on neuroinflammation and neuronal survival in the cerebellum and hippocampus. **J. Neuroinfla**, v.12, p.160, 2015.
- TWAROG, B. M.; PAGE, I. H. Serotonin content of some mammalian tissues and urine and a method for its determination. **Am. J. Physiol**, v.175, p.157-161, 1953.
- UNDERWOOD, M. D.; MANN, J. J.; ARANGO, V. Morphometry of Dorsal Raphe Nucleus Serotonergic Neurons in Alcoholism. **Alchol. Clin. Exp. Res.** v. 31, n. 5, p. 837-845, 2007.
- VALENZUELA, C. F.; PUGLIA, M. P.; ZUCCA, S. Focus on: neurotransmitter systems. **Alcoh. Res. Heal**, v. 34, n. 1, p. 106-120, 2011.
- VANGLENOVA, J.; PETKOV, V. V. Effect of maternal alcohol consumption on the lipid composition. **J. Neurochem**, v.22, p.697-703, 1998.
- VERGÉ, D; CALAS, A. Serotonergic neurons and serotonin receptor: gains from the cytochemical approaches. **J. Chem Neuroanat.** v. 18, p. 41-58, 2000.
- VERTES, R. P. A PHA-L analysis of ascending projections of the dorsal raphe nucleus in the rat. **J. Comp. Neurol.** v. 313, p. 643-668, 1991.

VERTES, R. P.; KOCSIS, B. Projections of the dorsal raphe nuclei to the brainstem: PHAL analysis in the rat. **J. Comp. Neurol.** v. 340, p. 11-26, 1994.

VERTES, R. P. et al. Projections of the median raphe nucleus in the rat. **J. Comp. Neurol.** v. 407, p. 11-26, 1999.

WARREN, K. R.; HEWITT, B. G.; THOMAS, J. D. Fetal alcohol spectrum: research challenges and opportunities. **Alcoh. Res. Heal**, v. 34, p. 4-14, 2011.

WARNER, R. H; ROSETT, H. L. The effects of drinking on offspring: an historical survey of the American and British literature. **J. Stud. Alcoh**, v. 36, p. 1395-1420, 1975.

WILLFORD, J. A.; RICHARDSON, G. A.; LEECH, S. L.; DAY, N. L. Verbal and visuospatial learning and memory function in children with moderate prenatal alcohol exposure. **Alcoh. Clin. Exp. Res**, v.28, p. 497–507, 2004.

WILLIAMS, J. F; SMITH, V. C. Fetal Alcohol Spectrum Disorders. **Pediatrics**, V. 136, p.1395-1406, 2015.

WHITAKER-AZMITIA, P. M.; AZMITIA, E. C. Autoregulation of fetal serotonergic neuronal development: role of high affinity serotonin receptors. **Neurosci. Lett**, v.67, p.307–312, 1986.

WHITAKER-AZMITIA, P. M. Role of the Neurotrophic Properties of Serotonin in the Delay of Brain Maturation Induced by Cocaine. **Ann. N Y. Acad. Sci**, v. 846, p.158-164, 1998.

WHITAKER-AZMITIA, P. M. Serotonin and brain development: role in human developmental diseases. **Brain. Res. Bull**, 2001, v.56, p.479-485, 2001.

WHO. WORLD HEALTH STATISTICS 2017: monitoring health for the SDGs, Sustainable Development Goals. Disponível em: <http://www.who.int/gho/en/>. Acesso em: janeiro de 2018.

YURITTAS, L.; DALE, B. E.; KLEM, W. R. Evidence for alcohol binding and dehydration in phospholipid and ganglioside micelles. **Alcoh. Clin. Exp. Res**, v.16, p.863-869, 1992.

ZILBERMA, M. L.; BLUME, S. B. Domestic violence, alcohol and substance abuse. **Rev. Bras. Psiqui**, v. 27, p. 51-55, 2005.

ZILBERMA, M. L.; TAVARES, H.; ANDRADE, A. G. Discriminating drug-dependent women from alcoholic women and drug-dependent men. **Addictive Behaviors**, v.28, p. 1343-1349, 2003.

ZHOU, F. C.; SARI, Y, ZHANG, J. K. Expression of serotonin transporter protein in developing rat brain, **Brain Res. Dev. Brain Res**, v.119, p. 33-45, 2000.

ZHOU, F. C.; SARI, Y.; LI, T. K.; GOODLETT, C.; AZMITIA, E. C. Deviations in brain early serotonergic development as a result of fetal alcohol exposure. **Neurotox. Res**, v.4, p.337–342, 2002.

ZHOU, F. C.; SARI, Y.; POWROZEK, T. A. Fetal alcohol exposure reduces serotonin innervation and compromises development of the forebrain along the serotonergic pathway. **Alcoh. Clin. Exp. Res.**, v.29, p.141–149, 2005.

ZHOU, F. C.; SARI, Y.; ZHANG, J. K.; GOODLETT, C. R.; LI, T. Prenatal alcohol exposure retards the migration and development of serotonin neurons in fetal C57BL mice. **Brain. Res. Dev. Brain. Res.**, v.126, p.147–155, 2001.

APÉNDICE



UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI - URCA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COMISSÃO DE EXPERIMENTAÇÃO E USO DE ANIMAIS
Rua Cel. Antonio Luis 1161, Pimenta
Fones: (088) 3102.1291 / Fax: (088) 3102.1291
CEP 63105-000 – Crato - CE - Brasil
propg@urca.br - www.urca.br/ceua



DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o projeto intitulado "EFEITOS DA INGESTÃO DO ETANOL A PARTIR DOS PERÍODOS PRÉ E PÓS-NATAL, SOBRE A MORFOLOGIA DE NÚCLEOS DOS SISTEMAS LÍMBICO E HIPOTALÂMICO DE CAMUNDONGOS", Processo Nº 00159/2017.1, foi **APROVADO** pela Comissão de experimentação e Uso de Animais – CEUA/URCA.

Marta Regina Kerntopf

Marta Regina Kerntopf

Vice-presidente do CEUA/URCA

CRATO-CE
2017