

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
LABORATÓRIO DE PSIQUIATRIA TRANSLACIONAL**

AMANDA KUNZ DE GODOI

**A RELAÇÃO ENTRE O *BINGE* ALCÓOLICO NO PERÍODO
GESTACIONAL DE RATAS *WISTAR* E O
DESENVOLVIMENTO DE ESQUIZOFRENIA NA VIDA
ADULTA DA PROLE**

**CRICIÚMA
2023**

AMANDA KUNZ DE GODOI

**A RELAÇÃO ENTRE O *BINGE* ALCÓOLICO NO PERÍODO
GESTACIONAL DE RATAS *WISTAR* E O
DESENVOLVIMENTO DE ESQUIZOFRENIA NA VIDA
ADULTA DA PROLE**

Dissertação de Mestrado apresentado
ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde para obtenção do
título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador(a): Prof^a. Dr^a. Alexandra
Zugno

**CRICIÚMA
2023**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

G588r Godoi, Amanda Kunz de.

A relação entre o *binge* alcóolico no período gestacional de ratas *Wistar* e o desenvolvimento de esquizofrenia na vida adulta da prole / Amanda Kunz de Godoi. - 2023.
69 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2023.
Orientação: Alexandra Zugno.

1. Esquizofrenia. 2. Beber em binge - Efeito fisiológico. 3. Álcool - Efeito fisiológico. 4. Grávidas - Uso de álcool. 5. Neurotransmissores. I. Título.

CDD 23. ed. 616.8982



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO, INOVAÇÃO E EXTENSÃO
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)
Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria N° 609 de 14.03.2019

ATA DE Mestrado em Ciências da Saúde – Nº 413

Com início às 14 (quatorze) horas do dia 28 (vinte e oito) de junho de 2023 (dois mil e vinte e três), realizou-se, na Sala 202/Bloco R2 o seminário formal de apresentação dos resultados da dissertação de Mestrado de **AMANDA KUNZ DE GODOI**, sob a orientação da Profa. Dra. **Alexandra Ioppi Zugno**, intitulada “**A RELAÇÃO ENTRE O BINGE ALCÓOLICO NO PERÍODO GESTACIONAL DE RATAS Wistar E O DESENVOLVIMENTO DE ESQUIZOFRENIA NA VIDA ADULTA DA PROLE**”. A dissertação foi examinada por uma banca constituída pelos seguintes membros: Profa. Dra. **Josiane Budni** (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovada, Profa. Dra. **Fabricia Cardoso Petronilho** (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovada, e Prof. Dr. **Gustavo Ferreira** (Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ) – Conceito final: Aprovada. Com o resultado final: **APROVADA**, a aluna finalizou seus estudos em nível de Mestrado, fazendo jus ao grau de **MESTRA EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**. Os trabalhos foram concluídos às 16h (dezesesseis) horas, dos quais eu, **Samiris Albano Pereira**, Assistente Administrativo do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC lavrei a presente ata, que assino juntamente com o Prof. Dr. **Emilio Luiz Streck**, Coordenador do Programa. Criciúma, 28 (vinte e oito) de junho de 2023 (dois mil e vinte e três).

Prof. Dr. Emilio Luiz Streck
Coordenador do PPGCS

Samiris Albano Pereira
Assistente Administrativo

FOLHA INFORMATIVA

A dissertação foi elaborada seguindo a resolução 07/2015 do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde na Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC. Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Psiquiatria Translacional do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde na Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente a Deus, o universo e/ou a vida, por ter passado por mais uma etapa de crescimento. Creio que há um propósito para a forma e o momento em que as coisas acontecem e, sem dúvidas, finalizo o mestrado sendo uma pessoa e profissional melhor.

A mim, por ter desenvolvido ainda mais força e resiliência diante das dificuldades. Por ter me permitido aprender e aproveitar inteiramente a experiência. Por encontrar tempo e me dedicar ao desenvolvimento pessoal e profissional.

Aos meus pais, Sandra e Elemar, pelos valores ensinados, por incentivar, apoiar e, muitas vezes, abdicar dos seus desejos para que eu pudesse realizar os meus sonhos. Sou o que sou, graças aos seus exemplos. Minha eterna gratidão e amor.

A minha irmã, Sofia, que foi o melhor presente dado pelos meus pais e quem mais me motiva a ser uma pessoa melhor. Muitas vezes me deu força, mesmo sem perceber.

Aos meus familiares, amigos e colegas de trabalho, que contribuíram de alguma forma.

A minha orientadora, Alexandra ou “Cuca”, pela condução e construção deste trabalho. Aos meus colegas do laboratório de Psiquiatria Translacional e aos colaboradores da universidade que contribuíram em cada etapa e tornaram possível a sua execução.

Aos professores das disciplinas do mestrado que, com a sua qualificação, tornaram estes dois anos de formação uma experiência rica em conteúdo e inspiração.

A relatora e aos membros da banca que disponibilizaram o seu tempo para a contribuição neste trabalho.

A Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC) pela formação acadêmica diferenciada e de qualidade, desde a graduação e iniciação científica até o mestrado.

E finalmente, a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por proporcionar esta experiência através do fomento.

Muito obrigada a todos!

RESUMO

A esquizofrenia é um transtorno mental crônico que afeta cerca de 1% da população mundial. A sua etiologia e fisiopatologia não são completamente conhecidas. Todavia, estudos apontam para a hipótese de alterações do neurodesenvolvimento, em que adversidades no início do segundo trimestre de gestação, como a exposição pré-natal ao álcool, podem levar à ativação de circuitos neurais patológicos durante o início da idade adulta, resultando no surgimento de sintomas da esquizofrenia. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a relação entre o *binge* alcóolico no período gestacional de ratas *Wistar* e o desenvolvimento de esquizofrenia na vida adulta da prole. Foram utilizadas 24 ratas *Wistar* para o acasalamento. As ratas gestantes foram divididas em dois grupos maternos: mães controle (MC) e mães álcool (MA). No 11º dia de gestação, ocorreu uma única administração de água ou álcool (25%) na dose de 3g/Kg via gavagem. Aos 60 dias de vida, a prole foi submetida ao modelo animal de esquizofrenia (induzido por cetamina - CET) e aos testes comportamentais de atividade locomotora, interação social e inibição por pré-pulso do reflexo de sobressalto. Posteriormente, a prole foi eutanasiada e suas estruturas cerebrais (hipocampo e estriado) foram dissecadas para avaliação dos níveis de dopamina e serotonina. Os resultados indicam que a cetamina reproduziu o modelo animal de esquizofrenia ao induzir hiperlocomoção dos machos e fêmeas e aumento de latência para a interação social das fêmeas. A hiperlocomoção foi persistente nas fêmeas filhotes do grupo álcool (FA) + CET. Os machos FA+CET tiveram redução do *rearing*. Na interação social, o *binge* alcóolico, associado ou não ao modelo de esquizofrenia, demonstrou aumento do tempo de contato social nas fêmeas (FA+SAL e FA+CET) e aumento do número de contato dos machos (FA+SAL). Ao avaliar o desempenho cognitivo, os machos do grupo FA+SAL demonstraram déficit de IPP comparado aos grupos cetamina dos filhotes do grupo controle (FC+CET) e álcool (FA+CET). Também foram observados níveis elevados de serotonina e dopamina no estriado dos machos e reduzidos de dopamina no estriado das fêmeas dos grupos FA+CET. Com este estudo pode-se concluir que os efeitos da exposição ao *binge* alcóolico no 11º dia de gestação foram persistentes na vida adulta da prole submetida ou não ao modelo animal de esquizofrenia induzido por cetamina.

Palavras-chave: *Binge* alcóolico; comportamento; esquizofrenia; gestação; neurotransmissores.

ABSTRACT

Schizophrenia is a mental disorder that affects approximately 1% of the world's population. Its etiology and pathophysiology are not fully understood. Studies point to a neurodevelopmental model as a possible cause. Therefore, adversities during the early stages of the second trimester of pregnancy, such as prenatal exposure to alcohol, can lead to the activation of pathological neural circuits during early adulthood, resulting in schizophrenia like symptoms. The objective of this study was to evaluate the cognitive performance and neurotransmitter levels in radial structures of adult Wistar rats that exhibited characteristics of the animal model of schizophrenia. These rats had mothers who were exposed to an alcoholic binge on the 11th day of pregnancy, which is equivalent to the second trimester of human pregnancy. For breeding, twenty-four Wistar rats were used. The pregnant rats were divided into two groups: control mothers (MC) and alcoholic mothers (MA). On the 11th day of pregnancy, a single dose of water or alcohol (25%) at a dose of 3g/Kg was administered via gavage. At 60 days of age, the offspring were tested using the animal model of schizophrenia (ketamine-induced) and behavioral tests for locomotor activity, social interaction, and the prepulse startle reflex. Subsequently, the rats were euthanized, and their brain structures (hippocampus and striatum) were dissected to assess dopamine and serotonin levels. It can be concluded that ketamine reproduced the animal model of schizophrenia by inducing hyperlocomotion in both male and female rats and increased latency of social interaction in female rats. Hyperlocomotion was persistent in FA+CET females. FA+CET males showed reduced motivation. Regarding social interaction, the alcoholic binge, whether associated with the schizophrenia model or not, resulted in increased social contact time in females (FA+SAL and FA+CET) and an increased number of contacts in males (FA+SAL). In assessing cognitive performance, males in the FA+SAL group exhibited a deficit in PPI compared to the ketamine groups (FC+CET and FA+CET). Changes were also observed in serotonin levels in the striatum of males and dopamine levels in the striatum of both males and females in the FA+CET groups. The symptoms demonstrated that the effects of exposure to an alcoholic binge on the 11th day of gestation persisted into adulthood in the offspring, regardless of whether they exhibited the animal model of ketamine-induced schizophrenia or not.

Key words: Alcoholic binge; behavior; schizophrenia; gestation; neurotransmitters.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADH: Álcool desidrogenase
AIQ: Amplitude interquartil
AMPA: Alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico
ANOVA: Análise de variância
ANVISA: Agência nacional de vigilância sanitária
APGs: Antipsicóticos de primeira geração
ASGs: Antipsicóticos de segunda geração
CET: Cetamina
CEUA: Comissão de ética em pesquisa no uso de animais
CONCEA: Conselho nacional de controle de experimentação animal
CYP2E1: Citocromo P450 2E1
DA: Dopamina
DRD1: Receptores dopaminérgicos D₁
DRD2: Receptores dopaminérgicos D₂
DSM-V: Manual de diagnóstico e estatística dos transtornos mentais
E.P.M: Erro padrão da média
EGTA: Ácido tetra acético
EPM: Erro padrão da média
FA: Filhotes do grupo materno álcool
FASD: Distúrbios do espectro alcoólico fetal
FC: Filhotes do grupo materno controle
GABA: Ácido gama-aminobutírico
GABA_A: Gama-aminobutírico A
HPLC: Cromatografia líquida de alta eficiência
IL: Interleucina
IPP: Inibição por pré-pulso do reflexo do sobressalto
LSD: Dietilamida do ácido lisérgico
LTP: Potencialização de longo prazo (do inglês, Long - term potentiation)
MA: Mães álcool
MC: Mães controle
NMDA: N-Metil-D-Aspartato
P: Pulso
PBS: tampão fosfato
PMSF: Flúor fenilmetilsulfonil
PolyI:C: Ácido polirribonucleotídico-poliribocitidílico
PP: Pré-pulso
SAF: Síndrome alcoólica fetal
SAL: Salina

SNC: Sistema nervoso central

TNF- α : Fator de necrose tumoral alfa

UNESC: Universidade do Extremo Sul Catarinense

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Desenho experimental.....	22
Figura 2: Distância total percorrida em cm pela prole adulta.....	31
Figura 3: Distância total percorrida em cm pela prole adulta, comparando machos e fêmeas.....	32
Figura 4: Número de <i>rearing</i> da prole adulta.....	33
Figura 5: Latência em segundos da prole adulta.....	34
Figura 6: Número total de contatos da prole adulta.....	35
Figura 7: Tempo total de contatos da prole adulta.....	36
Figura 8: Avaliação da função sensório-motora (a partir do teste de IPP) de machos adultos.....	37
Figura 9: Avaliação da função sensório-motora (a partir do teste de IPP) de fêmeas adultas.....	38
Figura 10: Níveis de serotonina no hipocampo e estriado de ratos machos adultos.....	39
Figura 11: Níveis de serotonina no hipocampo e estriado de ratas fêmeas adultas.....	40
Figura 12: Níveis de dopamina no hipocampo e estriado de ratos machos adultos.....	41
Figura 13: Níveis de dopamina no hipocampo e estriado de ratas fêmeas adultas.....	42

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	8
1.1 ESQUIZOFRENIA.....	8
1.2 EXPOSIÇÃO EMBRIONÁRIA AO ÁLCOOL E A SUA RELAÇÃO COM O DESENVOLVIMENTO DE ESQUIZOFRENIA	11
1.3 ESQUIZOFRENIA E NEUROTRANSMISSORES	14
1.4 MODELO ANIMAL DE ESQUIZOFRENIA	18
2. OBJETIVOS.....	20
2.1 OBJETIVO GERAL.....	20
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
3. MATERIAIS E MÉTODOS	21
3.1 ASPECTOS BIOÉTICOS	21
3.2 DESENHO EXPERIMENTAL	21
3.3 PROTOCOLO DE <i>BINGE</i> ALCÓOLICO	23
3.4 MODELO ANIMAL DE ESQUIZOFRENIA	23
3.5 TESTES COMPORTAMENTAIS	24
3.5.1 Atividade locomotora.....	26
3.5.2 Interação social.....	26
3.5.3 Inibição por pré-pulso do reflexo do sobressalto (IPP)	27
3.6 ANÁLISES BIOQUÍMICAS	28
3.6.1 Dosagem de proteínas	28
3.6.2 Condições Cromatográficas para dosagem de monoaminas – CLAE.....	28
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	29
4. RESULTADOS	30
4.1 TESTES COMPORTAMENTAIS	30
4.1.1 Atividade locomotora.....	30
4.1.2 Interação Social.....	33
4.1.3 Inibição por pré-pulso do reflexo de sobressalto – IPP.....	36
4.2 ANÁLISES BIOQUÍMICAS	38
4.2.1 Serotonina.....	38
4.2.2 Dopamina	40
5. DISCUSSÃO.....	43
6. CONCLUSÃO	51
REFERÊNCIAS	52
ANEXO A – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO PELO CEUA... 69	

1. INTRODUÇÃO

1.1 ESQUIZOFRENIA

Os sintomas observados atualmente para a esquizofrenia foram descritos por médicos durante toda a história. Mas apenas no século XIX foi reconhecida como uma condição médica e a partir disso, a descrição da esquizofrenia geralmente é creditada ao psiquiatra francês Benedict Morel, que a denominou como demência precoce, uma vez que os sintomas surgiam no início da vida levando a problemas psíquicos futuros. Alguns anos depois, o psiquiatra suíço Eugen Bleuler introduziu o termo esquizofrenia (esquizo = divisão, phrenia = mente) indicando a existência de uma separação entre pensamento, emoção e comportamento (Kaplan e Sadock, 2017).

A esquizofrenia é um transtorno mental crônico que afeta cerca de 1% da população mundial (Insel, 2010; Velligan e Rao, 2023). Tem um profundo impacto no indivíduo, sua família e sociedade, sendo considerado um dos transtornos que mais leva à incapacidade crônica (Javitt, 2010), com taxas de desemprego de 80-90%, expectativa de vida reduzida de 10 à 20 anos, significativo risco de suicídio (Owen et al., 2016) e grande custo para o sistema público, tanto em termos de perda da produtividade, como pelo tratamento contínuo com antipsicóticos (Chien et al., 2008; Koyama et al., 2008).

Os sintomas são caracterizados em três classes: sintomas positivos, sintomas negativos e déficits cognitivos. Os sintomas positivos são chamados de sintomas psicóticos nos quais há perda de contato com a realidade, como os delírios, alucinações e pensamentos desorganizados. Os sintomas negativos correspondem ao embotamento afetivo, retraimento social, redução da fala espontânea, anedonia e redução da motivação. Os déficits cognitivos referem-se principalmente a memória de trabalho, aprendizagem, desorganização do pensamento e falta de atenção (Joyce e Roiser, 2007; Shamsi et al., 2011). Em geral, a esquizofrenia rompe a maior parte das funções humanas básicas de percepção, emoção e julgamento (Pickard, 2011).

O primeiro episódio de psicose geralmente ocorre no final da adolescência ou no início da idade adulta, geralmente marcada por uma alteração abrupta no perfil social e afetivo (Marsman et al., 2013), que varia de acordo com a vulnerabilidade do indivíduo, podendo evoluir para a cronicidade (Graeff e Brandão, 1999). Frequentemente é precedido por uma fase prodrômica (ou um estado mental de risco) e, em alguns casos, deficiências pré-mórbidas na cognição e/ou funcionamento social ocorrem antes do aparecimento dos sintomas propriamente ditos. Com o passar do tempo, os sintomas positivos tendem a ter remissão, enquanto os sintomas negativos e cognitivos tendem a ser crônicos e estão associados a efeitos de longo prazo na função social (Lieberman et al., 2001; Lewandowski et al., 2011).

O diagnóstico é baseado descrição de sinais e sintomas associados a um funcionamento profissional ou social prejudicado. De acordo com critérios estabelecidos pelo Manual de Diagnóstico e Estatística dos Transtornos Mentais (DSM-V), os sinais devem estar presentes durante seis meses e incluir pelo menos um mês de sintomas ativos para se firmar o diagnóstico. Indivíduos com o transtorno apresentam variações substanciais na maior parte das características, uma vez que a esquizofrenia é uma síndrome clínica heterogênea (APA, 2013).

Para o tratamento, inicialmente, foram desenvolvidos os antipsicóticos de primeira geração (APGs), que reduzem os sintomas positivos do transtorno. No entanto, tem menos impacto nos sintomas negativos e cognitivos e os indivíduos apresentam sérios efeitos colaterais extrapiramidais, como tremor, fala arrastada, acatisia, distonia, ansiedade, angústia, paranoia e bradifrenia (Farde, 2011). Posteriormente, a introdução de antipsicóticos de segunda geração (ASGs) ofereceram vantagens como melhora dos sintomas negativos e déficits cognitivos. Contudo, apresentam outros efeitos adversos relacionados à síndrome metabólica (Tajima et al., 2009; Leucht et al., 2011).

A esquizofrenia não tem a sua etiologia e fisiopatologia completamente elucidadas e não é possível estabelecer uma relação direta de causa e efeito (Georgieff, 2018). Segundo Brown e Patterson (2012), as origens da esquizofrenia abrangem fatores

ambientais e genéticos, que, por meio de mecanismos interativos, parecem desempenhar papéis importantes no transtorno. Todavia, nos últimos anos, a esquizofrenia tem sido cada vez mais considerada um transtorno do neurodesenvolvimento (Catts et al., 2013; Brown e Patterson, 2012).

O neurodesenvolvimento em humanos é um processo longo, elaborado e altamente coordenado, envolvendo três trimestres de desenvolvimento pré-natal, seguidos por décadas de desenvolvimento e maturação pós-natal. Durante todo esse período, o cérebro é altamente sensível e responsivo ao ambiente externo, o que pode fornecer uma variedade de situações que levam a desfechos positivos ou negativos (Alberry et al., 2021).

Um ambiente fetal anormal ocorre quando fatores que deveriam estar presentes durante um período crítico de desenvolvimento estão ausentes (deficiências nutricionais por exemplo) ou quando fatores que não deveriam estar no cérebro em desenvolvimento estão presentes (exposição pré-natal ao álcool por exemplo) (Georgieff, 2018). Estes eventos podem alterar a expressão de genes que são críticos para a função neural do adulto e resultar em danos estruturais permanentes ao SNC (Hensch, 2004; Georgieff, 2018). Podendo ser específicos de circuito e região, alterando a atividade de circuitos implicados na etiologia de transtornos psiquiátricos neurodesenvolvimentais, como a esquizofrenia (Georgieff, 2018).

Assim, estudos demonstraram que adversidades na vida gestacional, como: ativação imune materna (Brown, 2012), nutrição pré-natal (Mcgrath et al., 2010), complicações obstétricas (Brown, 2011), estresse materno (Khashan et al., 2008) e uso de substâncias tóxicas materno (Van Os et al., 2010) no final do primeiro ou início do segundo trimestre de gestação, estão associadas com um maior risco de psicose na prole (Brown e Patterson, 2012).

1.2 EXPOSIÇÃO EMBRIONÁRIA AO ÁLCOOL E A SUA RELAÇÃO COM O DESENVOLVIMENTO DE ESQUIZOFRENIA

O álcool é uma das substâncias psicoativas mais utilizadas no mundo (WHO, 2018). Dados acerca da prevalência populacional do consumo de álcool na gestação são escassos na maioria dos países. No entanto, uma revisão sistemática e metanálise de Popova et al. (2017), com base em estudos existentes, estimou que, globalmente, cerca de 10% das mulheres na população geral consomem álcool durante a gestação. Esse percentual pode ser mais alto em algumas regiões devido a fatores culturais e sociais. Por exemplo, o consumo entre as gestantes pode chegar a 25,2% na União Europeia e até a 60,5% entre indígenas inuítes no norte de Quebec. Além disso, a prevalência de crianças residentes em orfanatos no Brasil com diagnóstico de Síndrome Alcoólica Fetal (SAF), uma das manifestações clínicas do uso de álcool na gestação, é 14 vezes maior que a população geral (Popova et al., 2017).

O álcool é uma substância teratogênica com efeitos irreversíveis no sistema nervoso central (SNC). Quando é consumido pela gestante, atravessa a placenta com rapidez e atinge concentrações no feto semelhantes às do sangue materno. No entanto, o fígado fetal possui pouca atividade da enzima álcool desidrogenase (ADH) e citocromo P450 2E1 (CYP2E1), responsáveis pela sua metabolização (Arfsten et al., 2004; Masters e Trevor, 2017). Assim, ocorre o seu acúmulo amniótico, onde permanece até retornar à circulação sanguínea materna e ser metabolizado (Zelner e Koren, 2013). O álcool também atravessa a barreira hematoencefálica e pode afetar o neurodesenvolvimento (Petrelli et al., 2018) e gerar uma gama de resultados neurocomportamentais conhecidos como distúrbios do espectro alcoólico fetal (FASD), através de diversos mecanismos a depender dos padrões de consumo e do estágio de desenvolvimento (Mattson et al., 2019).

Os padrões de consumo são caracterizados pela quantidade e frequência de álcool ingerido (Petrelli et al., 2018). O Instituto

Nacional de Abuso de Álcool e Alcoolismo define o consumo excessivo de álcool, ou “*binge* alcoólico”, para as mulheres como o consumo de quatro ou mais doses em cerca de duas horas (NIAAA, 2004). Quando uma gestante consome em *binge*, expõe o feto a altas concentrações de álcool em períodos relativamente curtos e podem resultar em déficits comportamentais e cognitivos mais graves do que os padrões de consumo contínuo (Mattson et al., 2019). Kelly et al. (1987) avaliaram ratos neonatos expostos a mesma dose de etanol em dois padrões de consumo diferentes: padrão contínuo e agudo. Observaram que os ratos expostos agudamente tiveram maior pico de concentração de álcool sanguíneo e menor crescimento cerebral em comparação com os animais expostos ao padrão contínuo (Kelly et al., 1987).

Além disso, a exposição pré-natal ao álcool afeta a organogênese cerebral de forma diferente dependendo do estágio de desenvolvimento (Almeida et al., 2020). Estudos em animais demonstraram os efeitos de acordo com equivalentes de trimestres humanos. Equivalente ao primeiro trimestre: dismorfologias cranianas, malformações cerebrais e tratos alterados de substância cinzenta e branca (Sulik e Johnston; 1983; Lipinski et al., 2012; Parnell et al., 2014). Equivalente ao segundo trimestre: malformações craniofaciais e cerebrais, distúrbios do neurodesenvolvimento e restrição do crescimento fetal (Dilworth et al., 2011; Kajimoto et al., 2013; Morton et al., 2014; Parnell et al., 2014; Nirgudkar et al., 2016). Equivalente ao terceiro trimestre: anormalidades cerebrais e distúrbios do neurodesenvolvimento (Coleman et al., 2012; Karacay et al., 2015; Wilson et al., 2016).

Além do diagnóstico formal de FASD, altas taxas de transtornos psiquiátricos são observadas na infância, adolescência e idade adulta (Streissguth et al., 1991; Steinhausen et al., 1993;), incluindo transtornos de substâncias, transtornos do humor, transtornos psicóticos, transtornos de personalidade, transtornos de ansiedade e transtornos alimentares (Famy et al., 1998; O’Connor e Paley, 2006; Fryer et al., 2007). O dano fetal pelo álcool também está associado ao início da esquizofrenia (Slavney et al., 1978; Lohr e Bracha, 1989; Stoos et al., 2015).

Os transtornos psiquiátricos observados em indivíduos expostos ao álcool no período pré-natal são considerados deficiências secundárias. Em contrapartida, estudos com animais sugerem que, na verdade, podem ser resultado de efeitos primários de alterações neurobiológicas induzidas pelo álcool que aumentam a vulnerabilidade destes indivíduos desenvolverem transtornos psiquiátricos (Mattson et al., 2019). Uma revisão de Patten et al. (2014), demonstrou várias alterações comportamentais importantes na idade adulta, em animais expostos ao álcool no período pré-natal, como a hiperatividade motora, baixo desempenho na aprendizagem reversa, prejuízo na memória de trabalho e espacial, deficiência do aprendizado, comportamento social perturbado e discriminação olfatória comprometida.

Pode-se dizer que as consequências da exposição pré-natal ao álcool perduram por toda a vida do indivíduo. É de extrema relevância a compressão dos impactos na vida adulta, visto que o custo para a sociedade advém justamente dos efeitos de longo prazo (Georgieff, 2018). No entanto, essa avaliação em humanos tem sido limitada, pois é um desafio distinguir os efeitos da exposição pré-natal ao álcool daqueles de um ambiente de criação pós-natal adverso (Pei et al., 2011; Landgren et al., 2019). Assim, os modelos animais desempenham um papel fundamental no estudo desses efeitos.

Pesquisadores tem observado que as alterações neuroquímicas observadas nos modelos animais, em especial, no sistema glutamatérgico, podem estar relacionadas com os distúrbios comportamentais e psicopatologias característicos deste transtorno (Maaswinkel et al., 2013). Um estudo de Ikonomidou et al. (2000) demonstrou que a exposição embrionária ao etanol em ratos no sétimo dia pós-natal, equivalente ao terceiro trimestre de gestação em humanos, levou a apoptose neuronal generalizada através do bloqueio de receptor N-Metil-D-Aspartato (NMDA) e ativação excessiva do receptor gama-aminobutírico A ($GABA_A$), resultando em redução da massa cerebral e distúrbios neurocomportamentais na idade adulta.

Estudos realizados com peixe-zebra também mostraram que a exposição ao álcool durante o desenvolvimento embrionário pode

causar alterações significativas na neurotransmissão glutamatérgica no cérebro da prole adulta (Baggio et al., 2017; Baggio et al., 2020). Baggio et al. (2017) mostraram uma redução dose-dependente da captação cerebral de glutamato. Outro estudo realizado por Baggio et al. (2020) também demonstrou uma ligação reduzida de glutamato às membranas cerebrais, diminuição da atividade $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPase}$ e redução da atividade da glutamina sintetase. Bem como alterações comportamentais na idade adulta, com redução da interação social e comportamento ansioso (Baggio, 2018).

Diante do exposto pode-se dizer que a exposição ao álcool no período gestacional está relacionada com alterações no neurodesenvolvimento e, conseqüentemente, com a fisiopatologia da esquizofrenia. Dados da literatura indicam que o ambiente intrauterino inadequado favorece a incidência de esquizofrenia na idade adulta e alterações neurobiológicas nos sistemas de neurotransmissores, como o sistema glutamatérgico, podem estar entre os mecanismos fisiopatológicos subjacentes aos transtorno, como será mencionado a seguir.

1.3 ESQUIZOFRENIA E NEUROTRANSMISSORES

A fisiopatologia da esquizofrenia ainda não é completamente conhecida (Meyer e Feldon, 2010). Entretanto, não há dúvidas da existência de alterações anatômicas, moleculares e bioquímicas cerebrais em sua gênese (Keshavan et al., 2011). A hipótese dopaminérgica é a mais conhecida e primeiramente estudada, que relaciona os sintomas da esquizofrenia com uma desregulação na neurotransmissão dopaminérgica no cérebro (Lodge e Grace, 2011).

No entanto, evidências mostraram que a fisiopatologia central da esquizofrenia pode envolver disfunção na sinalização dopaminérgica, glutamatérgica, serotoninérgica e do ácido gama-aminobutírico (GABA). Estes circuitos podem estar conectados e agirem simultaneamente, levando a danos em diversas funções características da esquizofrenia (Stahl, 2018).

A “hipótese dopaminérgica” surgiu porque observou-se que pacientes com esquizofrenia tem elevada capacidade de síntese de dopamina (DA) (Hietala et al., 1995; Howes et al., 2012), relacionada com a hiperfunção nas vias mesolímbica e nigro-estriatal (regiões associadas a sensopercepção e controle da motricidade) e consequente hiperatividade da sinalização, via receptores dopaminérgicos D₂ (DRD2), em regiões subcorticais como o corpo estriado, com papel significativo no desenvolvimento de sintomas positivos (Katzung e Trevor, 2017).

Essa hipótese foi apoiada pela correlação entre a eficácia de antipsicóticos no tratamento dos sintomas positivos da esquizofrenia e sua potência de antagonizar os DRD2, e consequentemente, levar também aos efeitos colaterais extrapiramidais (Katzung e Trevor, 2017). Bem como pela capacidade de agonistas dopaminérgicos, como a anfetamina, induzirem a liberação excessiva de DA estriatal e estimular psicose semelhante à esquizofrenia (Meyer et al., 2011).

No entanto, os sintomas negativos e cognitivos permanecem resistentes ao tratamento com antagonistas de DRD2, sugerindo que eles podem ser devidos a um déficit na transmissão de DA do córtex pré-frontal (região associada às funções cognitivas), via receptores dopaminérgicos D₁ (DRD1) (Katzung e Trevor, 2017).

De acordo com essa hipótese de desequilíbrio cortical/subcortical na esquizofrenia, a neurotransmissão de DA hipoativa no córtex pré-frontal resulta em hipoestimulação de DRD1 (causando sintomas negativos e cognitivos) leva à desinibição da atividade de DA mesolímbica subcortical, resultando em hiperestimulação de DRD2 (causando sintomas positivos de esquizofrenia) (Davis et al., 1991; Meyer-Lindenberget al., 2002; Sesack e Carr, 2002). Por sua vez, a hiperatividade dopaminérgica no estriado atenua os produtos inibitórios GABAérgicos para o núcleo médio dorsal (Obeso et al., 2007). Este núcleo, está relacionado com a esquizofrenia devido a sua ligação com o córtex pré-frontal (Fuster, 2001).

Porém, a teoria dopaminérgica sozinha não explica completamente a fisiopatologia da esquizofrenia, uma vez que não é capaz de desvendar as razões subjacentes ao início dos sintomas

na fase jovem-adulta, as alterações cognitivas e em estruturas cerebrais e o fato dos antipsicóticos não serem igualmente eficazes (Johnstone et al., 1976). Sugerindo que a esquizofrenia é o resultado de alterações em um ou mais sistemas de neurotransmissores (Miyamoto et al., 2003; Harrison e Weinberger, 2005; Lara et al., 2006; Pickard, 2011; Boison et al., 2012).

Devido ao fato de o sistema dopaminérgico ser modulado pelo glutamatérgico e este sistema estar envolvido em importantes funções cognitivas, como memória e aprendizagem, foi postulada a “hipótese glutamatérgica” da esquizofrenia (Javitt, 2010). Essa hipótese se concentra na deficiência da sinalização dos receptores de glutamato NMDA (Poels et al., 2014). A ativação dos receptores NMDA resulta em aumento de longa duração da força sináptica, um processo designado como potencialização de longo prazo (LTP, de *long-term potentiation*), que constitui um importante tipo de plasticidade sináptica e corresponde a um mecanismo celular subjacente à memória e aprendizagem (Katzung e Trevor, 2017).

Os principais achados que sustentam a hipótese glutamatérgica é que o tratamento com antagonistas de receptores NMDA gera um bloqueio no poro do canal iônico, impedindo o influxo de cálcio e o processo LTP. Isso provoca sintomas psicóticos transitórios e reversíveis em pacientes não esquizofrênicos e exacerba os sintomas de pacientes com esquizofrenia, bem como induzem a desregulação dopaminérgica semelhante a esquizofrenia. Sugerindo que a hipofunção nos receptores NMDA está relacionada à fisiopatologia da esquizofrenia (Bressan e Pilowsky, 2003). Assim, fármacos antagonistas de receptores NMDA, como a cetamina, vem sendo utilizados como modelo animal para induzir a esquizofrenia (Heylmann e al., 2017).

É importante ressaltar que existe uma diferença dependente de gênero sobre a densidade de células piramidais (Gould et al. 1990; Hajszan et al. 2008), número de receptores NMDA, afinidade e/ou composição das subunidades (Smith e McMahon 2006; Taherianfard et al. 2012; Vedder et al. 2013) e em medidas de toxicidade dependente de NMDA e plasticidade sináptica (de Olmos et al. 2008; Smith et al. 2010). O mecanismo pelo qual isto

ocorre ainda é desconhecido, podendo estar relacionado às diferenças de ações hormonais (Aubele e Kritzer, 2012) na mediação homeostática de dopamina, com origem na ativação mediada pela área tegumentar ventral (Locklear et al., 2016).

A hipótese da serotonina da esquizofrenia é baseada nos primeiros estudos de interações entre a droga alucinógena dietilamida do ácido lisérgico (LSD) e serotonina (Aghajanian e Marek, 2000). Observações dos efeitos psicotogênicos do LSD e dos efeitos antipsicóticos dos antagonistas da serotonina-dopamina, como a clozapina e a risperidona, levaram ao aumento do interesse na interação entre esses dois sistemas de neurotransmissores como um possível alvo fisiopatológico na esquizofrenia (Kapur e Remington, 1996).

Os antagonistas da serotonina melhoram os efeitos extrapiramidais dos antipsicóticos. Entretanto, evidências diretas de disfunção serotoninérgica na patogênese da esquizofrenia ainda não estão disponíveis. Receptores específicos de serotonina parecem estar envolvidos (particularmente 5HT-3 e 5HT-6) nos mecanismos fisiopatológicos deste transtorno (Abi-Dargham, 2007).

Stahl (2018) sugere que o excesso de ativação dos receptores de serotonina 5HT_{2A} na doença de Parkinson, demência ou psicose, resulta em hiperatividade glutamatérgica se projetando para a área tegmental ventral, ativando a via mesolímbica da dopamina como parte de uma reação em cadeia, causando alucinações auditivas e delírios característicos da esquizofrenia.

Como visto, anormalidades nos sistemas dopaminérgicos, glutamatérgicos, serotoninérgicos e GABAérgicos podem estar conectadas e agirem simultaneamente, levando a um funcionamento aberrante de interneurônios que se manifesta como disfunção cognitiva, comportamental e social, através do funcionamento alterado de uma ampla gama de macro e microcircuitos (Yang e Tsai, 2017). No entanto, evidências diretas de transmissão alterada em sistemas de monoaminas têm sido bastante limitadas. A via da serotonina tem um papel importante na sinalização cerebral, no entanto, seu papel na esquizofrenia não

é tão estudado quanto o da via da dopamina (Hrovatin et al., 2020), demonstrando a necessidade de novos estudos acerca do assunto.

1.4 MODELO ANIMAL DE ESQUIZOFRENIA

Um modelo animal amplamente utilizado na esquizofrenia envolve a administração repetida ou aguda de cetamina (Canever et al., 2010; Monte et al., 2013; Zugno et al., 2013a, Zugno et al., 2013b; Zugno et al., 2016). Este fármaco tem sido usado clinicamente como um anestésico dissociativo que atua com múltiplos mecanismos de ação, incluindo o antagonismo não-competitivo do receptor NMDA de glutamato e como agonista do receptor dopaminérgico DRD2 com uma afinidade ligeiramente menor pelos receptores serotoninérgicos 5-HT2 (Kapur e Seeman, 2002; Kapur e Mamo, 2003).

Os antagonistas de receptores NMDA agem impedindo o influxo de cálcio através da membrana plasmática do neurônio, o que induz um estado psicótico transitório e reversível em indivíduos saudáveis (Javitt et al., 2010; Frohlich e Van Horn, 2014). Em animais, o bloqueio repetido do receptor NMDA induz hiperatividade, dificuldades de interação social, déficits de inibição por pré-pulso do reflexo do sobressalto (IPP) e déficits de memória, os quais se assemelham aos sintomas da esquizofrenia em humanos (Hunt et al, 2006; Canever et al., 2010), além de mimetizar alterações bioquímicas, como a modulação da atividade do sistema dopaminérgico, cuja disfunção é relevante na esquizofrenia (Salgado et al., 2006).

Assim, o uso da cetamina como um modelo animal de esquizofrenia está bem consolidado na literatura, sendo que sua validade de face (mimetizar os sintomas do transtorno), de construto (habilidade do modelo em reproduzir alguns aspectos fisiopatológicos da doença) e preditiva (avaliar se os medicamentos clássicos usados no tratamento do transtorno previne e/ou reverte às alterações comportamentais e neuroquímicas induzidas no animal) estão comprovadas (Reddy e Yao, 1996; De Oliveira et al., 2009). Adicionalmente, a capacidade que a cetamina tem de induzir a maioria dos sintomas e déficits

associados à esquizofrenia, sugere que a disfunção do receptor NMDA está envolvida nas características do transtorno (Kantrowitz e Javitt, 2010).

Perante as evidências apresentadas, a exposição ao *binge* alcólico no período gestacional está relacionada com alterações no neurodesenvolvimento e, conseqüentemente, com a fisiopatologia da esquizofrenia. Alterações nos sistemas de neurotransmissores parecem estar envolvidos, mas os mecanismos ainda permanecem obscuros. Assim, a presente pesquisa é justificada por auxiliar no avanço para uma melhor compreensão quanto aos fatores relacionados à fisiopatologia da esquizofrenia e as agressões ambientais no período pré-natal, tendo em vista que as conseqüências perduram por toda a vida do indivíduo e o custo para a sociedade advém justamente dos efeitos de longo prazo.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a relação entre o *binge* alcóolico no período gestacional de ratas *Wistar* e o desenvolvimento de esquizofrenia na vida adulta da prole.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar parâmetros comportamentais de atividade locomotora, de ratos *Wistar* machos e fêmeas adultos submetidos ao modelo animal de esquizofrenia induzido por cetamina, cujas mães foram expostas a um *binge* alcóolico no 11º dia de gestação;
- Avaliar parâmetros comportamentais de interação social, de ratos *Wistar* machos e fêmeas adultos submetidos ao modelo animal de esquizofrenia induzido por cetamina, cujas mães foram expostas a um *binge* alcóolico no 11º dia de gestação;
- Avaliar parâmetros comportamentais de IPP, de ratos *Wistar* machos e fêmeas adultos submetidos ao modelo animal de esquizofrenia induzido por cetamina, cujas mães foram expostas a um *binge* alcóolico no 11º dia de gestação;
- Avaliar os níveis de dopamina no hipocampo e estriado, de ratos *Wistar* machos e fêmeas adultos submetidos ao modelo animal de esquizofrenia induzido por cetamina, cujas mães foram expostas a um *binge* alcóolico no 11º dia de gestação;
- Avaliar os níveis de serotonina no hipocampo e estriado, de ratos *Wistar* machos e fêmeas adultos submetidos ao modelo animal de esquizofrenia induzido por cetamina, cujas mães foram expostas a um *binge* alcóolico no 11º dia de gestação.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ASPECTOS BIOÉTICOS

Este estudo é considerado do tipo experimental, utilizando um modelo animal. Essa pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética em Pesquisa no Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC) sob o protocolo de número 09/2022 (Anexo A) e os procedimentos foram executados de acordo com o Instituto Nacional de Guia de Saúde para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório e as recomendações do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) projetado para minimizar o sofrimento e limitar o número de animais utilizados.

Para o estudo, foram utilizados 120 ratos *Wistar* adultos no total, sendo 24 fêmeas para o acasalamento e 96 ratos da respectiva prole (48 machos e 48 fêmeas), com 60 dias de vida, pesando em média 250g a 300g. Os animais foram obtidos do Biotério da Universidade e foram mantidos em gaiolas em ciclos de 12h dia-noite, com alimentação e água disponíveis e temperatura entre $22^{\pm} 1^{\circ}$ C. Foram acondicionados em caixas de polipropileno (41x34x16 cm), 5 ratos por caixa, exceto no período entre o acasalamento e o desmame.

Os procedimentos para a realização deste protocolo foram realizados nas dependências do Laboratório de Psiquiatria Translacional pertencente à instituição de ensino UNESC.

3.2 DESENHO EXPERIMENTAL

Conforme o desenho experimental representado na figura 1, foram utilizadas 24 ratas *Wistar* adultas para o acasalamento. As ratas gestantes foram divididas aleatoriamente em dois grupos maternos: mães controle (MC) e mães álcool (MA). No 11^o dia de gestação, foi realizada uma única administração de água ou álcool (25%) na dose de 3g/Kg via gavagem intragástrica, conforme o grupo materno. A prole permaneceu sob os cuidados maternos até

o 21º dia de vida, quando ocorreu o desmame. No qual a prole de machos e fêmeas foi separada em caixas de cinco animais.

Quando atingiram os 60 dias de vida, os filhotes machos e fêmeas provenientes de MC e MA foram subdivididos em 4 diferentes grupos (descritos na tabela 1) e receberam tratamento repetido (sete dias) com salina ou cetamina (25 mg/kg) via i.p. Após a última administração, foram submetidos aos testes comportamentais de atividade locomotora, interação social e inibição por pré-pulso do reflexo de sobressalto. Posteriormente, foram eutanasiados e suas estruturas cerebrais hipocampo e estriado foram dissecadas para as análises bioquímicas dos níveis de dopamina e serotonina.

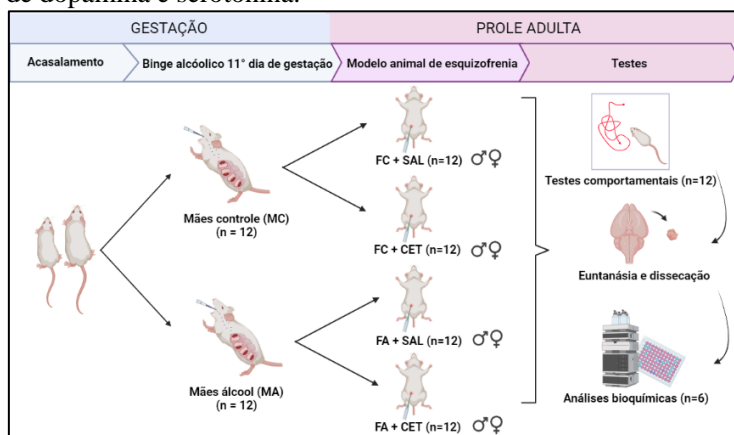


Figura 1 – Desenho experimental. Foram utilizadas 24 ratas *Wistar* adultas para o acasalamento. As ratas gestantes foram divididas em dois grupos maternos: mães controle (MC) e mães álcool (MA). No 11º dia de gestação, as ratas gestantes foram submetidas ao protocolo de *binge* alcóolico. Aos 60 dias de vida, os filhotes machos e fêmeas provenientes de MC e MA foram subdivididos em 4 diferentes grupos e foram submetidos ao modelo animal de esquizofrenia. Após a última administração de cetamina ou salina, foram submetidos aos testes comportamentais de atividade locomotora, interação social e inibição por pré-pulso do reflexo de sobressalto. Posteriormente, foram eutanasiados e suas estruturas cerebrais hipocampo e estriado foram dissecadas para as análises bioquímicas de dopamina e serotonina. Fonte: da autora, 2022.

3.3 PROTOCOLO DE *BINGE* ALCÓOLICO

Foram utilizadas 24 ratas *Wistar* adultas virgens, pesando entre 100g a 350g. Projetando minimizar o estresse dos animais e melhor manejo para os testes comportamentais, os procedimentos com as ratas foram realizados em duas fases com o intervalo de 14 dias. Assim, na primeira fase, utilizou-se 12 ratas *Wistar* para formar o grupo materno denominado: “mães controle” (MC) (n=12). Na segunda fase, mais 12 ratas *Wistar* foram utilizadas para formar o grupo materno denominado: “mães álcool” (MA) (n=12). Para o acasalamento, cada rata fêmea foi mantida em uma caixa com um único rato macho durante 48 horas. Após o acasalamento, permaneceram isoladas uma por caixa durante toda a gestação. No 11º dia de gestação, foram pesadas por balança digital única e receberam 3g/kg de água (grupo MC) ou álcool (25%) (grupo MA) via gavagem intragástrica. A dose foi escolhida com o objetivo de alcançar uma concentração de álcool no sangue superior a 200mg/dL e simular um consumo em *binge*, conforme descrito por Patten et al. (2014). Em ambas as fases, após o período de gestação, os ratos filhotes foram mantidos junto à mãe para a amamentação por 21 dias. Em seguida, os filhotes foram submetidos ao desmame e sexagem. Aos 60 dias de vida foram submetidos ao modelo animal de esquizofrenia e aos testes comportamentais.

3.4 MODELO ANIMAL DE ESQUIZOFRENIA

A prole adulta permaneceu com alimentação e água disponíveis até completar 60 dias de vida. Ao chegarem à fase adulta, foram divididos em 4 diferentes grupos (Tabela 1) para seguir o protocolo de indução do modelo animal de esquizofrenia.

Tabela 1: Separação dos animais por grupo de exposição ao *binge* alcóolico no período pré-natal e tratamento com cetamina na fase adulta.

Grupos: prole de machos e fêmeas na fase adulta	
Machos	Fêmeas
1. FC + SAL	1. FC + SAL
2. FC + CET	2. FC + CET
3. FA + SAL	3. FA + SAL
4. FA + CET	4. FA + CET

FC: filhotes do grupo materno controle. FA: filhotes do grupo materno álcool. SAL: salina. CET: cetamina. N = 12 animais por grupo. Fonte: da autora, 2022.

Foram realizadas injeções intraperitoneais (i.p.) de cetamina (25 mg/kg) ou salina, uma vez ao dia, durante sete dias (tratamento repetido). A dose de cetamina foi preparada em solução salina no volume de 1mL/100g, de acordo com a literatura (Canever et al., 2010; Zugno et al., 2013a, Zugno et al., 2013b; Zugno et al., 2016).

Após a última administração de cetamina ou salina, os animais foram submetidos às análises comportamentais de atividade locomotora, interação social e IPP. Posteriormente, foram decapitados em guilhotina e suas estruturas cerebrais, hipocampo e estriado foram dissecadas, congeladas em nitrogênio líquido e mantidas em freezer -80°C para posteriores análises bioquímicas.

3.5 TESTES COMPORTAMENTAIS

Foram avaliados os parâmetros comportamentais de atividade locomotora, interação social e IPP de ratos *Wistar* machos e fêmeas adultos submetidos ao modelo animal de esquizofrenia induzido por cetamina, cujas mães foram expostas a um *binge* alcóolico no 11º dia de gestação.

Projetando minimizar o estresse dos animais, os procedimentos com as mães foram realizados em duas fases, como descrito anteriormente, e os testes comportamentais foram realizados em dois dias. No primeiro dia, os animais foram submetidos aos testes de atividade locomotora e interação social. No segundo dia, submetidos ao teste de IPP e, posteriormente, eutanásia (tabela 2).

Tabela 2: Divisão das duas fases de testes comportamentais realizados na prole adulta indicada na tabela 1.

Divisão dos testes comportamentais			
Fase	Dia	Atividade locomotora + Interação social	IPP + eutanásia
1 ^a	1 ^o	Grupo 1 - machos	
	2 ^o	Grupo 2 - machos	Grupo 1 - machos
	3 ^o	Grupo 1 - fêmeas	Grupo 2 - machos
	4 ^o	Grupo 2 - fêmeas	Grupo 1 - fêmeas
	5 ^o		Grupo 2 – fêmeas
2 ^a	1 ^o	Grupo 3 - machos	
	2 ^o	Grupo 4 - machos	Grupo 3 - machos
	3 ^o	Grupo 3 - fêmeas	Grupo 4 - machos
	4 ^o	Grupo 4 - fêmeas	Grupo 3 - fêmeas
	5 ^o		Grupo 4 - fêmeas

Na primeira fase foram realizados os testes comportamentais dos filhotes do grupo materno MC no total de 5 dias, sendo dois dias de testes para cada grupo. Após o intervalo de 14 dias, na segunda fase, foram realizados os testes comportamentais dos filhotes do grupo materno MA no total de 5 dias, sendo dois dias de testes para cada grupo. N=12 animais por grupo.

Fonte: da autora, 2022.

3.5.1 Atividade locomotora

A hiperlocomoção farmacologicamente induzida é um importante indicador dos sintomas positivos associados à esquizofrenia (Van Den Buuse, 2010). Assim, o objetivo do teste é avaliar as mudanças comportamentais quando os ratos são colocados em um novo ambiente. À medida que os animais sentem ansiedade, medo ou tem problemas de adaptação em um novo ambiente, as atividades exploratórias tendem a aumentar (Tsuchie et al., 2013).

Desta forma, trinta minutos após a última administração de salina ou cetamina, os animais foram submetidos individualmente à exploração em uma caixa de atividade locomotora com 50 x 25 x 50 cm de dimensão durante o período de 15 minutos. O teste foi realizado em um equipamento (Activity Monitor, Insight Laboratory Equipment, Ribeirão Preto, SP) que calcula a distância percorrida (cm) pelo animal, (dividindo o tempo total de avaliação em blocos de 5 minutos) e o *rearing* (número de movimentos de elevação da pata dianteira, sem tocar as paredes do campo aberto – atividade vertical) (De Oliveira et al., 2009; Canever et al., 2010).

3.5.2 Interação social

O teste de interação social indica o perfil social dos animais, estando relacionado aos sintomas negativos da esquizofrenia (Neill et al., 2014). Vários estudos demonstraram a inibição da interação social, induzida por antagonistas do receptor NMDA em animais (Sams-Dodd, 1999; Becker e Grecksch, 2004; Canever et al., 2010). Assim, a diminuição da interação social vem sendo estudada como um comportamento característico (sintoma negativo) em modelos animais de esquizofrenia e autismo (Schneider e Przewlocki, 2005; Diccico-Bloom et al., 2006).

No dia do experimento, após a última injeção de salina ou cetamina, os animais foram isolados socialmente em caixa de material plástico mensurando 43 x 28 x 15 cm, privados de água e comida por um período de seis horas antes do experimento. Posteriormente, animais de caixas diferentes, porém do mesmo

grupo experimental, foram organizados em duplas, e colocados no campo aberto, uma caixa de acrílico (60 x 60 x 30 cm) com piso sólido, para a realização do teste. O protocolo utilizado foi descrito por Niesink e Van Ree (1989) e Schneider e Przewlocki (2005). O comportamento social dos animais foi avaliado de par em par e não individualmente.

O teste ocorreu por um período de 15 minutos e foram analisados três parâmetros comportamentais: o tempo de latência (em segundos) para iniciar o contato entre os animais (seguir ou se aproximar do parceiro, a montagem sobre o parceiro, o cheirar ou *grooming* de qualquer parte do corpo do parceiro); o número total de contatos sociais e o tempo total em que os animais permanecem em contato (Niesink e Van Ree, 1989; Schneider e Przewlocki, 2005).

Como o ambiente do teste é desconhecido, a tendência normal é haver alguns minutos de atividade exploratória junto com as interações sociais, e como o experimento é realizado durante ao dia, os animais controles usualmente acabam adormecendo juntos ao final do teste. A latência indica o grau de ansiedade, visto que o animal está no mesmo ambiente que outro rato desconhecido. O tempo total e o número de contatos quantificam a preferência do animal pelo contato com o animal desconhecido, ao invés de explorar o ambiente (Canever et al., 2010).

3.5.3 Inibição por pré-pulso do reflexo do sobressalto (IPP)

O teste de IPP, é um modelo utilizado para avaliar o filtro sensorio-motor (Salum et al., 2008). A IPP é uma forma de plasticidade do reflexo do sobressalto, que ocorre naturalmente em humanos e na maioria dos animais experimentais, mas está diminuída ou ausente em esquizofrênicos (Mansbach et al., 1988). A IPP é caracterizada por uma redução normal no sobressalto em resposta a um estímulo auditivo intenso (pulso), quando este é precedido imediatamente (30-500 ms) por um estímulo mais fraco (pré-pulso) (Weiss e Feldon, 2001). A ativação de processos cerebrais é aumentada em resposta ao estímulo fraco, o que impede a responsividade a eventos sensoriais posteriores durante uma

rápida janela temporal. Este período protege a informação contida no estímulo inicial, para que seja adequadamente processada, durante o qual, somente estímulos suficientemente grandes serão capazes de ultrapassar este filtro protetor (Salum et al., 2008).

A quantificação da IPP foi realizada com base no protocolo descrito por Kinkead et al. (2006). Foram utilizadas caixas de medida de sobressalto com vedação sonora (Insight® - EP 175), nas quais a amplitude do sobressalto foi quantificada após a apresentação de um estímulo sonoro, sendo que durante todo o tempo foi produzido um ruído de fundo de 65 dB. Os animais permaneceram por um período de habituação de 5 minutos nessas caixas. Durante a sessão, foram apresentados 3 tipos de estímulos por 10 vezes e distribuídos randomicamente em intervalos médios de 20 segundos: 1) Pulsos de 120 dB por 40 ms (capaz de produzir uma resposta de sobressalto); 2) Pré-Pulsos de 65, 70 ou 75 dB por 20 ms apresentados 80 ms antes do pulso; 3) ausência de estímulo. No início de cada sessão, 10 pulsos foram apresentados para a habituação dos animais (essa série não foi levada em conta para os cálculos). A média da amplitude de sobressalto após as sessões de PULSO (P) bem como a média da amplitude da resposta de sobressalto após as sessões de PRÉ-PULSO (PP) foram calculadas para cada animal.

3.6 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

3.6.1 Dosagem de proteínas

As proteínas foram mensuradas de acordo com o método de Lowry et al. (1951) e a albumina sérica bovina foi utilizada como padrão.

3.6.2 Condições Cromatográficas para dosagem de monoaminas – CLAE

A dosagem de monoaminas foi realizada utilizando o método cromatográfico proposto por De Benedetto et al. (2014) com

adaptações. A separação cromatográfica foi realizada com coluna de fase reversa, Ascentis® C18 (250 mm x 2.1 mm 5 µm; Supelco®, USA), e sistema cromatográfico composto por uma bomba de distribuição da fase móvel LC-20AT acoplada a um autosampler SIL-20A_{HT}, e um detector de fluorescência RF-20A; Shimadzu (Kyoto, Japan), o software para aquisição de dados em cromatografia foi o LCSolution. O volume de injeção das amostras foi de 20 µL, com temperatura de análise de 35 °C. A taxa de bombeamento da fase móvel foi de 0,3 mL/min. A detecção por fluorescência, monitorados nos comprimentos de onda de excitação em 279 nm e de emissão 320 nm. O perfil da fase móvel foi isocrático: tampão acetato (pH 3,5, ácido acético 12 mM, 0,26 mM EDTA) e metanol (86:14, v/v). Os picos foram identificados e quantificados por comparação do seu tempo de retenção na solução da amostra com a da solução padrão, por meio de curva de calibração.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística dos resultados foi utilizado o software GraphPad Prism 8.0.2. A investigação da normalidade das variáveis quantitativas foi realizada pelo teste de Shapiro-Wilk. Quando o resultado foi $p < 0,05$, realizou-se a análise de variância (ANOVA) de uma via, seguido pelo post hoc Tukey, quando F foi significativo. Na avaliação da atividade locomotora comparando machos e fêmeas, realizou-se ANOVA de duas vias, seguido pelo post hoc de Sidak. Os dados foram expressos como média (\pm) e erro padrão da média (média \pm E.P.M) e a significância estatística foi considerada para valores de $p < 0,05$. Quando o teste de Shapiro-Wilk foi $p < 0,05$, foi realizado o teste de Kruskal-Wallis, seguindo pelo post hoc de Dunn's. As variáveis quantitativas foram expressas por meio de mediana e amplitude interquartil (AIQ) e a significância estatística também foi considerada para valores de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 TESTES COMPORTAMENTAIS

4.1.1 Atividade locomotora

A figura 2 representa a distância total percorrida em cm pela prole adulta de machos (A) e fêmeas (B) submetidos ao modelo animal de esquizofrenia, cujas mães foram expostas ao *binge* alcóolico no 11º dia de gestação. Na figura 2A, ANOVA de uma via demonstrou diferença significativa entre os grupos de machos [$F(3,42)=7,599$; $p=0,0004$]. Observou-se hiperlocomção dos machos do grupo FC+CET quando comparado aos grupos FC+SAL ($p=0,0006$) e FA+SAL ($p=0,0017$). Na figura 2B, ANOVA de uma via demonstrou diferença significativa entre os grupos de fêmeas [$F(3,44)=15,92$; $p<0,0001$]. Observou-se hiperlocomção das fêmeas do grupo FC+CET quando comparadas aos grupos FC+SAL ($p=0,0038$) e FA+SAL ($p=0,0127$) e também das fêmeas do grupo FA+CET quando comparadas aos mesmos grupos, FC+SAL ($p<0,0001$) e FA+SAL ($p<0,0001$).

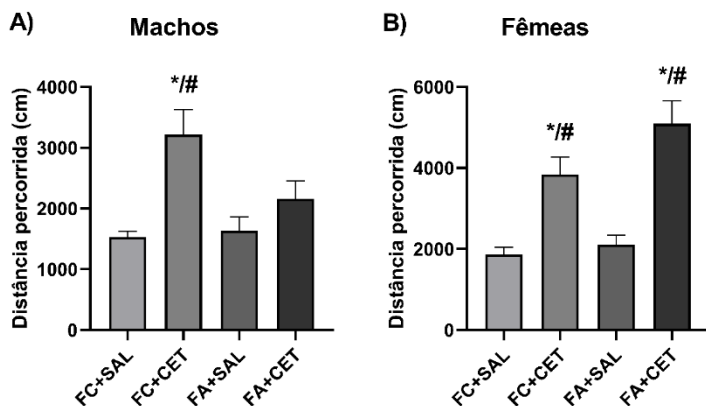


Figura 2 – Distância total percorrida em cm pela prole adulta de machos (A) e fêmeas (B) submetidos ao modelo animal de esquizofrenia, cujas mães foram expostas ao *binge* alcóolico no 11º dia de gestação. Os valores foram expressos como média ± EPM (Erro Padrão da Média), sendo considerados significativos valores de $p < 0,05$, $n = 12$. * diferente do grupo controle (FC+SAL), # diferente do grupo álcool (FA+SAL), segundo ANOVA de uma via; Fonte: dados da autora, 2022.

Devido as diferenças observadas entre machos e fêmeas, realizou-se ANOVA de duas vias entre as variáveis: sexo e grupo (figura 3). O teste demonstrou diferença significativa [$F(3,86) = 6,237$; $p = 0,0007$], observando-se hiperlocomoção das fêmeas do grupo FA+CET quando comparadas aos machos do mesmo grupo ($p < 0,0001$).

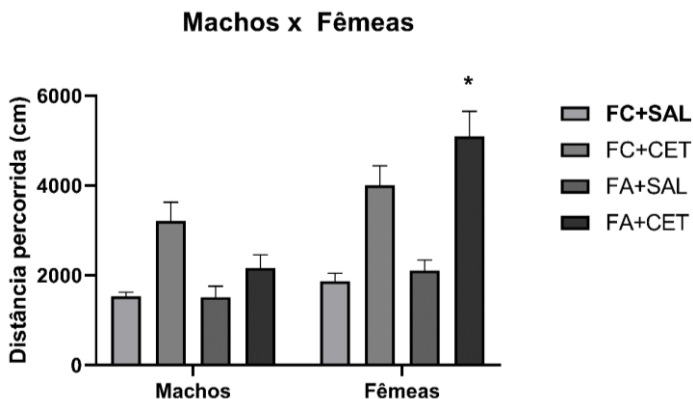


Figura 3 – Distância total percorrida em cm pela prole adulta, comparando machos e fêmeas submetidos ao modelo animal de esquizofrenia, cujas mães foram expostas ao *binge* alcóolico no 11º dia de gestação. Os valores foram expressos como média \pm EPM (Erro Padrão da Média), sendo considerados significativos valores de $p < 0,05$, $n = 12$. * diferente dos machos do mesmo grupo, segundo ANOVA de duas vias; Fonte: dados da autora, 2022.

A figura 4 representa o número de *rearing* da prole adulta de machos (A) e fêmeas (B) submetidos ao modelo animal de esquizofrenia, cujas mães foram expostas ao *binge* alcóolico no 11º dia de gestação. Na figura 4A, ANOVA de uma via demonstrou diferença significativa entre os grupos de machos [$F(3,42) = 3,861$; $p = 0,0158$]. Observou-se um menor número de *rearing* dos machos do grupo FA+CET quando comparado ao grupo controle (FC+SAL) ($p = 0,0124$). As fêmeas não apresentaram diferenças significativas no número de *rearing* [$F(3,43) = 0,1232$; $p = 0,9459$] (figura 4B).

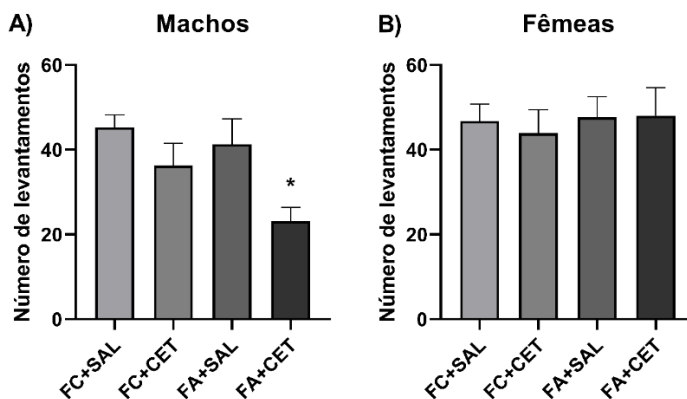


Figura 4 – Número de *rearing* da prole adulta de machos (A) e fêmeas (B) submetidos ao modelo animal de esquizofrenia, cujas mães foram expostas ao *binge* alcóolico no 11º dia de gestação. Os valores foram expressos como média ± EPM (Erro Padrão da Média), sendo considerados significativos valores de $p < 0,05$, $n = 12$. * diferente do grupo controle (FC+SAL), segundo ANOVA de uma via; Fonte: dados da autora, 2022.

4.1.2 Interação Social

A figura 5 representa a latência (tempo para o primeiro contato entre os animais) da prole adulta de machos (A) e fêmeas (B) submetidos ao modelo animal de esquizofrenia, cujas mães foram expostas ao *binge* alcóolico no 11º dia de gestação. Na figura 5A, o teste de Kruskal-Wallis não demonstrou diferença significativa na latência entre os grupos de machos ($p = 0,2358$). Na figura 5B, ANOVA de uma via demonstrou diferença significativa entre os grupos de fêmeas [$F(3,16) = 15,67$; $p < 0,0001$]. Observou-se aumento da latência das fêmeas do grupo FC+CET quando comparado aos grupos FC+SAL ($p = 0,0006$), FA+SAL ($p < 0,0001$) e FA+CET ($p = 0,0003$).

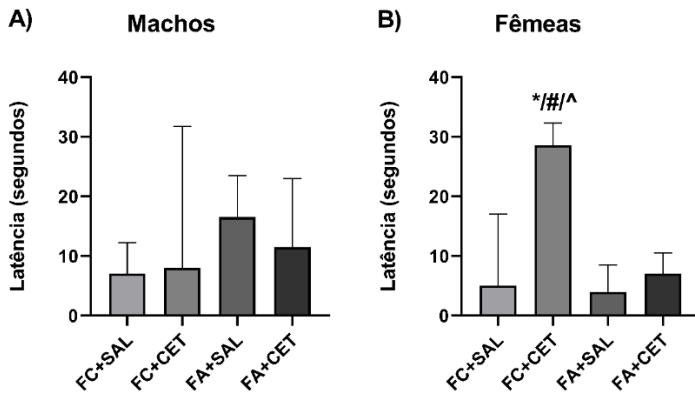


Figura 5 – Latência em segundos da prole adulta de machos (A) e fêmeas (B) submetidos ao modelo animal de esquizofrenia, cujas mães foram expostas ao *binge* alcóolico no 11º dia de gestação. A: os valores foram expressos como mediana \pm IQR (Intervalo Interquartil), sendo considerados significativos valores de $p < 0,05$, $n = 12$, segundo Kruskal-Wallis. B: os valores foram expressos como média \pm EPM (Erro Padrão da Média), sendo considerados significativos valores de $p < 0,05$, $n = 12$, segundo ANOVA de uma via. * diferente do grupo controle (FC+SAL), # diferente do grupo FA+SAL, ^ diferente do grupo FA+CET; Fonte: dados da autora, 2022.

A figura 6 representa o número total de contatos sociais da prole adulta de machos (A) e fêmeas (B) submetidos ao modelo animal de esquizofrenia, cujas mães foram expostas ao *binge* alcóolico no 11º dia de gestação. Na figura 6A, o teste de Kruskal-Wallis demonstrou diferença significativa entre os grupos de machos ($p = 0,0120$). Os machos do grupo FC+CET apresentaram um menor número de contatos sociais quando comparados ao grupo FA+SAL ($p = 0,0065$). Na figura 6B, ANOVA de uma via demonstrou diferença significativa entre os grupos de fêmeas [$F(3,20) = 4,817$; $p = 0,0110$]. As fêmeas do grupo FA+CET apresentaram um menor número de contatos sociais quando comparadas às fêmeas do grupo controle (FC+SAL) ($p = 0,0065$).

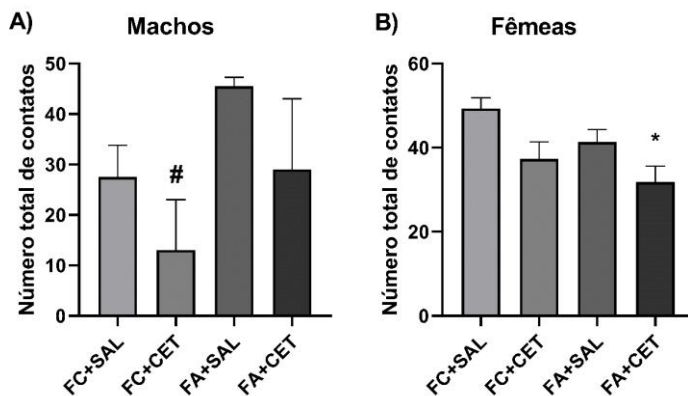


Figura 6 – Número total de contatos da prole adulta de machos (A) e fêmeas (B) submetidos ao modelo animal de esquizofrenia, cujas mães foram expostas ao *binge* alcóolico no 11º dia de gestação. A: os valores foram expressos como mediana ± IQR (Intervalo Interquartil), sendo considerados significativos valores de $p < 0,05$, $n=12$, segundo Kruskal-Wallis. B: os valores foram expressos como média ± EPM (Erro Padrão da Média), sendo considerados significativos valores de $p < 0,05$, $n=12$, segundo ANOVA de uma via. * diferente do grupo controle (FC+SAL), # diferente do grupo FA+SAL; Fonte: dados da autora, 2022.

A figura 7 representa o tempo total de contatos (em segundos) da prole adulta de machos (A) e fêmeas (B) submetidos ao modelo animal de esquizofrenia, cujas mães foram expostas ao *binge* alcóolico no 11º dia de gestação. Na figura 7A, ANOVA de uma via não demonstrou diferença significativa entre os grupos de machos [$F(3,20)=2,096$; $p=0,1329$]. Na figura 7B, ANOVA de uma via demonstrou diferença significativa entre os grupos de fêmeas [$F(3,20)=9,867$; $p=0,0003$]. As fêmeas do grupo FA+SAL apresentaram um maior tempo de contato social quando comparadas às fêmeas do grupo controle (FC+SAL) ($p=0,0260$). As fêmeas do grupo FA+CET também apresentaram maior tempo de contato social quando comparadas às fêmeas dos grupos controle (FC+SAL) ($p=0,0006$) e FC+CET ($p=0,0024$).

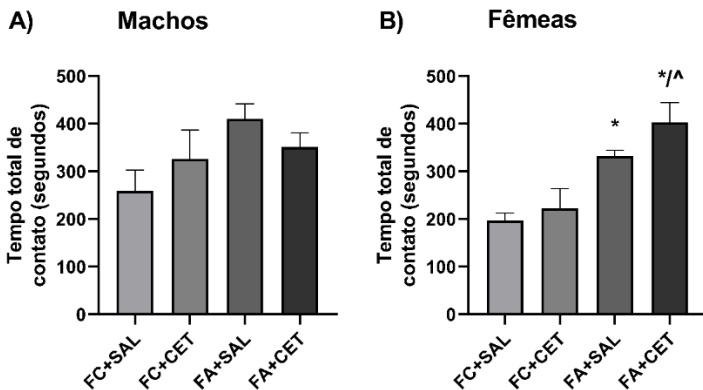


Figura 7 – Tempo total de contatos (segundos) da prole adulta de machos (A) e fêmeas (B) submetidos ao modelo animal de esquizofrenia, cujas mães foram expostas ao *binge* alcóolico no 11º dia de gestação. Os valores foram expressos como média ± EPM (Erro Padrão da Média), sendo considerados significativos valores de $p < 0,05$, $n = 12$. * diferente do grupo controle (FC+SAL), ^ diferente do grupo FC+CET, segundo ANOVA de uma via; Fonte: dados da autora, 2022.

4.1.3 Inibição por pré-pulso do reflexo de sobressalto – IPP

A figura 8 apresenta os resultados da avaliação da função sensorio-motora dos machos adultos submetidos ao modelo animal de esquizofrenia, cujas mães foram expostas ao *binge* alcóolico no 11º dia de gestação. O teste de Kruskal-Wallis demonstrou um prejuízo entre os machos do grupo FA+SAL quando comparados aos grupos FC+CET e FA+CET nas 3 intensidades avaliadas (Figuras 8A, 8B e 8C). Na intensidade de 65dB (figura 8A), os machos do grupo FA+SAL apresentaram diferença significativa quando comparados aos grupos FC+CET ($p = 0,0006$) e FA+CET e ($p = 0,0213$). Na intensidade de 70dB (figura 8B), os machos do grupo FA+SAL apresentaram diferença significativa quando comparados aos grupos FC+CET ($p = 0,0089$) e FA+CET e ($p = 0,0233$). Na intensidade de 75dB (figura 8C), os machos do grupo FA+SAL apresentaram diferença significativa quando

comparados aos grupos FC+CET ($p=0,0033$) e FA+CET ($p=0,0367$).

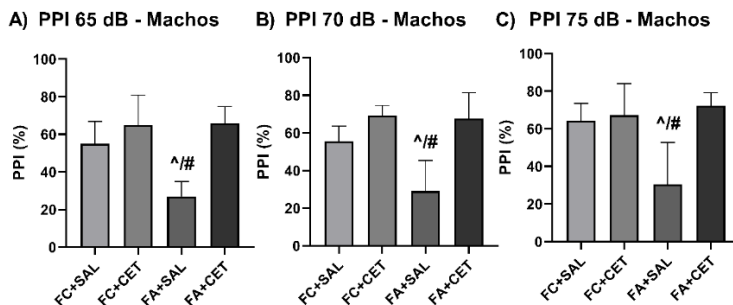


Figura 8 – Avaliação da função sensório-motora (a partir do teste de IPP) de machos adultos submetidos ao modelo animal de esquizofrenia, cujas mães foram expostas ao *binge* alcóolico no 11º dia de gestação. A, B e C representam as 3 intensidades de pré-pulso, respectivamente: 65dB, 70dB e 75dB. Os valores foram expressos como mediana \pm IQR (Intervalo Interquartil), sendo considerados significativos valores de $p < 0,05$, $n=12$. ^ diferente do grupo FC+CET, # diferente do grupo FA+CET, segundo Kruskal-Wallis; Fonte: dados da autora, 2022.

A figura 9 apresenta os resultados da avaliação da função sensório-motora das fêmeas adultas submetidos ao modelo animal de esquizofrenia, cujas mães foram expostas ao *binge* alcóolico no 11º dia de gestação. O teste de Kruskal-Wallis não demonstrou diferenças significativas entre as fêmeas nas 3 intensidades avaliadas: Figura 8A) 65dB ($p=0,9964$); figura 8B) 70dB ($p=0,6061$); figura 8C) 75dB ($p=0,2933$).

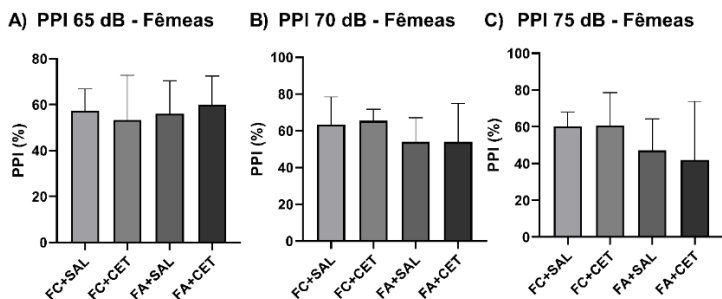


Figura 9 – Avaliação da função sensório-motora (a partir do teste de IPP) de fêmeas adultas submetidas ao modelo animal de esquizofrenia, cujas mães foram expostas ao *binge* alcóolico no 11º dia de gestação. A, B e C representam as 3 intensidades de pré-pulso, respectivamente: 65dB, 70dB e 75dB. Os valores foram expressos como mediana \pm IQR (Intervalo Interquartil), sendo considerados significativos valores de $p < 0,05$, $n=12$, segundo Kruskal-Wallis; Fonte: dados da autora, 2022.

4.2 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

4.2.1 Serotonina

A figura 10 apresenta os níveis de serotonina no hipocampo e estriado de ratos machos adultos submetidos ao modelo animal de esquizofrenia, cujas mães foram expostas ao *binge* alcóolico no 11º dia de gestação. Na figura 10A, ANOVA de uma via não demonstrou diferença significativa entre os níveis de serotonina no hipocampo dos machos [$F(3,19)=0,1292$; $p=0,9416$]. Enquanto na figura 10B, ANOVA de uma via demonstrou diferença significativa nos níveis de serotonina no estriado [$F(3,14)=8,310$; $p=0,0020$]. Os machos do grupo FA+CET apresentaram níveis elevados de serotonina no estriado quando comparados aos grupos FC+SAL ($p=0,0053$), FC +CET ($p=0,0280$) e FA+SAL ($p=0,0021$).

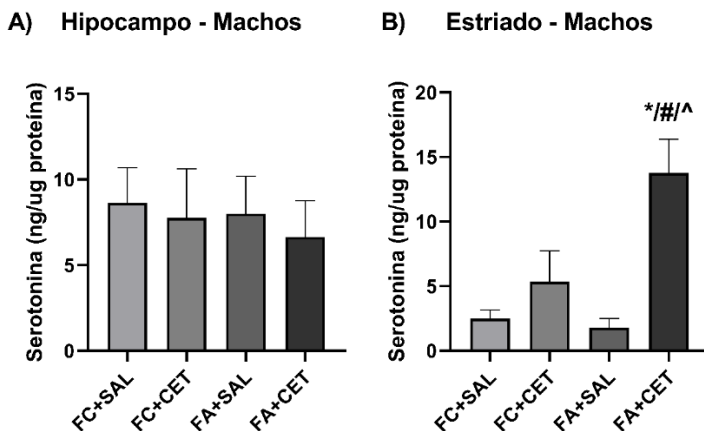


Figura 10 – Níveis de serotonina no hipocampo (A) e estriado (B) de ratos machos adultos submetidos ao modelo animal de esquizofrenia, cujas mães foram expostas ao *binge* alcóolico no 11º dia de gestação. Os valores foram expressos como média \pm EPM (Erro Padrão da Média), sendo considerados significativos valores de $p < 0,05$, $n=12$. * diferente do grupo controle (FC+SAL), # diferente do grupo FC+CET, ^ diferente do grupo FA+SAL, segundo ANOVA de uma via; Fonte: dados da autora, 2022.

A figura 11 apresenta os níveis de serotonina no hipocampo e estriado de ratas fêmeas adultas submetidas ao modelo animal de esquizofrenia, cujas mães foram expostas ao *binge* alcóolico no 11º dia de gestação. Na figura 11A, ANOVA de uma via não demonstrou diferença significativa entre os níveis de serotonina no hipocampo das fêmeas [$F(3,15)=1,973$; $p=0,1614$]. Na figura 11B, o teste de Kruskal-Wallis também não demonstrou diferenças significativas entre os níveis de serotonina no estriado das fêmeas ($p=0,0595$).

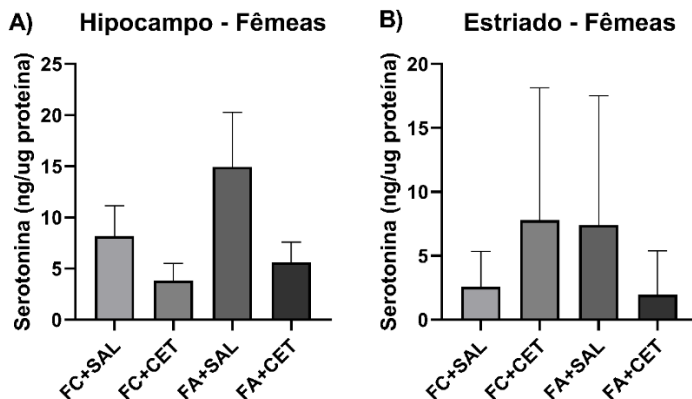


Figura 11 – Níveis de serotonina no hipocampo (A) e estriado (B) de ratas fêmeas adultas submetidas ao modelo animal de esquizofrenia, cujas mães foram expostas ao *binge* alcóolico no 11º dia de gestação. A: os valores foram expressos como média \pm EPM (Erro Padrão da Média), sendo considerados significativos valores de $p < 0,05$, $n = 12$, segundo ANOVA de uma via. B: os valores foram expressos como mediana \pm IQR (Intervalo Interquartil), sendo considerados significativos valores de $p < 0,05$, $n = 12$, segundo Kruskal-Wallis. Fonte: dados da autora, 2022

4.2.2 Dopamina

A figura 12 apresenta os níveis de dopamina no hipocampo e estriado de ratos machos adultos submetidos ao modelo animal de esquizofrenia, cujas mães foram expostas ao *binge* alcóolico no 11º dia de gestação. Na figura 12A, ANOVA de uma via não demonstrou diferença significativa entre os níveis de dopamina no hipocampo dos machos [$F(3,18) = 0,6153$; $p = 0,6140$]. Enquanto na figura 12B, o teste de Kruskal-Wallis demonstrou diferença significativa nos níveis de dopamina do estriado ($p = 0,0025$). Os machos do grupo FA+CET apresentaram níveis mais altos de dopamina no estriado quando comparados aos grupos FC+SAL ($p = 0,0306$) e FA+SAL ($p = 0,0246$).

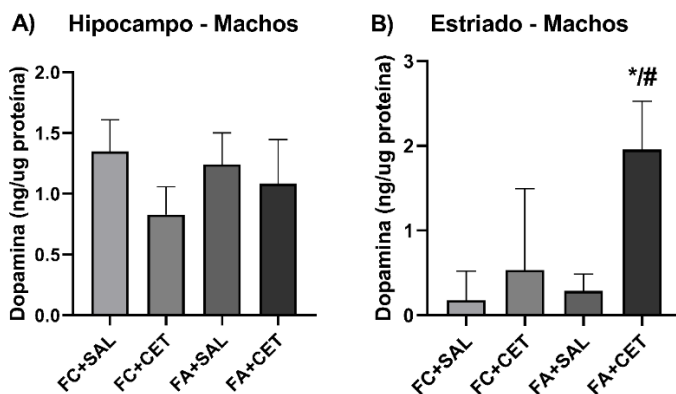


Figura 12 – Níveis de dopamina no hipocampo (A) e estriado (B) de ratos machos adultos submetidos ao modelo animal de esquizofrenia, cujas mães foram expostas ao *binge* alcóolico no 11º dia de gestação. A: os valores foram expressos como média \pm EPM (Erro Padrão da Média), sendo considerados significativos valores de $p < 0,05$, $n=6$, segundo ANOVA de uma via. B: os valores foram expressos como mediana \pm IQR (Intervalo Interquartil), sendo considerados significativos valores de $p < 0,05$, $n=6$, segundo Kruskal-Wallis. * diferente do grupo controle (FC+SAL), # diferente do grupo FA+SAL; Fonte: dados da autora, 2022.

A figura 13 apresenta os níveis de dopamina no hipocampo e estriado de ratas fêmeas adultas submetidas ao modelo animal de esquizofrenia, cujas mães foram expostas ao *binge* alcóolico no 11º dia de gestação. Na figura 13A, ANOVA de uma via não demonstrou diferença significativa entre os níveis de dopamina no hipocampo das fêmeas [$F(3,17)=0,6973$; $p=0,5664$]. Enquanto na figura 13B, ANOVA de uma via demonstrou diferença significativa no estriado [$F(3,13)=5,055$; $p=0,0154$]. As fêmeas do grupo FA+CET apresentaram níveis reduzidos de dopamina no estriado quando comparados ao grupo FA+SAL ($p=0,0110$).

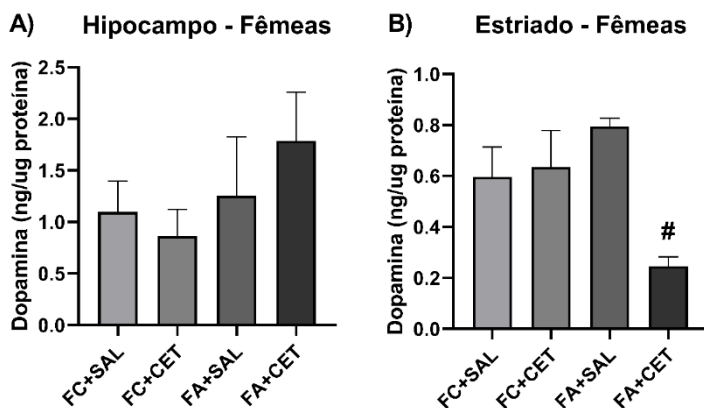


Figura 13 – Níveis de dopamina no hipocampo (A) e estriado (B) de ratas fêmeas adultas submetidas ao modelo animal de esquizofrenia, cujas mães foram expostas ao *binge* alcóolico no 11º dia de gestação. Os valores foram expressos como média \pm EPM (Erro Padrão da Média), sendo considerados significativos valores de $p < 0,05$, $n = 6$. # diferente do grupo FA+SAL, segundo ANOVA de uma via. Fonte: dados da autora, 2022.

5. DISCUSSÃO

A fisiopatologia da esquizofrenia ainda não é completamente conhecida (Meyer e Feldon, 2010). Entretanto, evidências mostraram que a fisiopatologia central da esquizofrenia pode envolver disfunção na sinalização dopaminérgica, glutamatérgica, serotoninérgica e do GABA, e que estes circuitos podem estar conectados e agirem simultaneamente, levando a danos em diversas funções características da esquizofrenia (Stahl, 2018).

É sabido que os sintomas positivos e negativos, bem como o prejuízo cognitivo observados na esquizofrenia podem ser atribuídos, a hipofunção dos receptores NMDA (Balla et al., 2009; Chatterjee et al., 2012). Esta hipofunção, localizada nos neurônios inibitórios GABAérgicos das regiões límbica e subcortical do cérebro, produz um aumento da atividade neuronal no circuito límbico-estriatal, devido ao aumento da liberação de glutamato, dopamina e serotonina, sendo este evento relacionado aos sintomas positivos da esquizofrenia. Ademais, a hipofunção dos receptores NMDA na área tegmental ventral induz uma menor liberação de dopamina no córtex pré-frontal, pois a produção basal de neurônios dopaminérgicos que se projetam para essa região está sob o controle excitatório dos receptores glutamatérgicos NMDA e receptores alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropionico (AMPA) na área tegmental ventral, bem como dos receptores AMPA no córtex pré-frontal, sendo portanto, esse bloqueio parcialmente responsável pelos sintomas negativos e cognitivos do transtorno (Chatterjee et al., 2012).

A hiperlocomução farmacologicamente induzida é um importante indicador dos sintomas positivos associados à esquizofrenia (Van Den Buuse, 2010). As atividades exploratórias dos animais podem ser refletidas pela deambulação (avaliada através da distância total percorrida) e exploração (avaliada através do *rearing*). Assim, o teste de atividade locomotora é muito utilizado para avaliar as mudanças comportamentais dos ratos quando colocados em um novo ambiente. À medida que sentem ansiedade, medo ou tem problemas de adaptação, as atividades exploratórias tendem a aumentar (Tsuchie et al., 2013).

O papel da dopamina no controle do movimento está razoavelmente bem definido, com envolvimento predominante dos sistemas dopaminérgicos mesolímbico e nigroestriatal. Em sua forma mais simples, o conceito de testar a hiperatividade locomotora baseia-se nas premissas de que o aumento da atividade dopaminérgica em roedores leva ao aumento da atividade motora, seja a distância total percorrida, *rearing* ou, até mesmo, comportamentos estereotipados (Van Den Buuse, 2010).

Corroborando com a literatura, os resultados demonstraram hiperlocomoção da prole de machos e fêmeas das MC que foram submetidos ao modelo animal de esquizofrenia na idade adulta, indicando que a cetamina isolada foi capaz de reproduzir os sintomas positivos associados a esquizofrenia em ambos os sexos. Já a prole (machos e fêmeas) das MA que não foi submetida ao modelo animal de esquizofrenia, não apresentou alterações significativas de locomoção. A hiperatividade é relatada com frequência em crianças com FASD (Driscoll et al., 1990) e estudos tem demonstrado esse comportamento também em ratos jovens (Tran et al., 2000). No entanto, assim como os resultados do presente estudo, Dursun et al. (2006) também não observaram hiperatividade nos ratos adultos. Por outro lado, foi relatada hiperatividade locomotora em ratos adultos após administração neonatal de álcool (Tran et al., 2000). Assim, é possível que no rato, o período neonatal precoce correspondente ao terceiro trimestre humano, represente a janela de tempo de maior vulnerabilidade para esta disfunção.

Ao avaliar a associação da exposição pré-natal a um *binge* alcóolico no segundo trimestre de gestação e o modelo animal de esquizofrenia na idade adulta, considera-se que o estressor pré-natal pode levar a alterações na regulação endócrina, mudanças epigenéticas e alterações no neurodesenvolvimento que podem resultar em resiliência ou vulnerabilidade quando expostos a outro estressor na idade adulta (Daskalakis et al., 2013). De acordo com os resultados do presente estudo, apenas as fêmeas demonstraram hiperatividade, portanto os resultados comportamentais foram diferentes de acordo com o sexo. Ao comparar as variáveis sexo e grupo, as fêmeas apresentaram hiperlocomoção quando

comparadas aos machos do mesmo grupo (FA+CET). Além disso, os machos deste grupo apresentaram o *rearing* diminuído quando comparados ao controle.

Outro modelo de neurodesenvolvimento utilizado para estudar a esquizofrenia é pelo tratamento pré-natal com Poly I:C, um análogo viral que leva a ativação imune materna. Zhang et al. (2012) demonstrou em seu estudo que o tratamento pré-natal com PolyI: C induziu hiperlocomoção na prole adulta. Em contrapartida, Howland et al. (2012) ainda demonstrou que o gênero da prole foi um determinante das respostas locomotoras, uma vez que as fêmeas apresentaram níveis significativamente mais altos de atividade locomotora do que os machos.

É possível que essas diferenças comportamentais reflitam alterações induzidas pela exposição pré-natal ao álcool nos circuitos do hipocampo, pois o dano ao hipocampo produz um padrão semelhante de hiperlocomoção em testes de campo aberto (Clark et al., 2006; Thompson et al., 2018). Os dimorfismos sexuais no desenvolvimento do hipocampo e nas estruturas celulares podem contribuir para esses efeitos específicos do sexo. Estudos mostram que as fêmeas exibem uma maturação mais rápida na densidade do sistema colinérgico do hipocampo, maior número de dendritos (Gould et al., 1990) e espinhos dendríticos na região CA3 do hipocampo em comparação com os machos (Mendell et al., 2017).

Por outro lado, a exposição pré-natal a um *binge* alcóolico no segundo trimestre de gestação e o modelo animal de esquizofrenia na idade adulta pode ter levado a outras alterações comportamentais dos machos. Osterlund Oltmanns et al. (2022) avaliou em seu estudo o comportamento de ratos expostos ao álcool no período pré-natal de forma crônica e moderada com relação a organização do campo aberto, baseado no conceito de que a atividade locomotora em campo aberto requer o processamento preciso de informações espaciais, ou seja, o comportamento espacial é organizado de forma que os animais estabeleçam “bases domésticas”. Em seus resultados, os animais expostos ao álcool exibiram hiperatividade e os machos

demonstraram mais suscetibilidade ao prejuízo na organização do comportamento de campo aberto.

Wang et al. (2023) também demonstrou em seu estudo que os animais expostos ao álcool durante o segundo trimestre de gestação, apresentaram um comportamento semelhante à ansiedade, levando a redução da atividade exploratória, especialmente o *rearing*. Quando os animais fazem o *rearing*, acabam tendo uma visão melhor para uma melhor exploração espacial e a redução deste comportamento pode ser um indicador de ansiedade em geral (Wang et al., 2023). O hipocampo está envolvido na navegação espacial e interconectado com centros de estresse, incluindo hipotálamo, amígdala e outras estruturas límbicas. Especificamente, a interconexão do hipocampo ventral com o hipotálamo desempenha um papel importante na regulação das respostas ao estresse (Tannenholz et al., 2014). Sabe-se que a exposição pré-natal ao álcool afeta as funções do hipocampo (Dodge et al., 2020) e alteram a sensibilidade do eixo HPA (Wieczorek et al., 2015), o que poderia mediar o aumento do comportamento do tipo ansiedade.

O teste de interação social é amplamente utilizado como teste comportamental pré-clínico de sintomas negativos associados a esquizofrenia (Neill et al., 2014). O teste consistiu em analisar três parâmetros comportamentais: o tempo de latência (em segundos) para iniciar o contato entre os animais, o número total de contatos sociais e o tempo total em que os animais permaneceram em contato. A latência indica o grau de ansiedade, visto que o animal está no mesmo ambiente que outro rato desconhecido. Já o tempo total e o número de contatos quantificam a preferência do animal pelo contato com o animal desconhecido, ao invés de explorar o ambiente (Canever et al., 2010).

Um grande corpo de evidências demonstra que a cetamina é capaz de induzir o isolamento social em humanos (Micallef et al., 2003) e animais (Gama et al., 2012; Zugno et al., 2013a; Zugno et al., 2016; Zugno et al., 2017), compatível com as alterações sociais encontradas em pacientes esquizofrênicos (Neill et al., 2010). No presente estudo, observa-se que as fêmeas submetidas apenas a cetamina apresentaram latência significativamente aumentada,

corroborando com a literatura. Enquanto os machos não apresentaram alterações significativas associadas a cetamina.

A exposição ao *binge* alcóolico pré-natal parece ter tido um efeito positivo sobre a interação social. As fêmeas expostas ao *binge* alcóolico pré-natal e ao modelo animal de cetamina apresentaram um número total de contatos reduzido, porém com o tempo de contato aumentado. Como o ambiente do teste é desconhecido, a tendência normal é haver alguns minutos de atividade exploratória junto com as interações sociais (Canever et al., 2010) e os resultados indicam que as fêmeas passaram mais tempo em contato social do que alternando entre exploração e interação social. Além disso, as fêmeas expostas apenas ao *binge* alcóolico apresentaram um tempo de contato social aumentado e os machos apresentaram um número de contatos aumentado quando comparados aos machos expostos somente à cetamina.

As alterações no comportamento social estão associadas aos FASD. Crianças, adolescentes e adultos apresentam dificuldades nas interações com seus pares e déficits na capacidade de resposta a sinais sociais (Streissguth et al., 199; Bookstein et al., 2002). O comportamento social de roedores de laboratório também é sensível à exposição pré-natal ao etanol. Estudos demonstraram alterações robustas no comportamento social de roedores expostos ao álcool durante o desenvolvimento do cérebro em uma ampla gama de durações de exposição, tempo, doses e idades no momento da quantificação comportamental (Middleton et al., 2012; Tunc-Ozcan et al., 2013; Hamilton et al., 2014; Varlinskaya e Mooney, 2014).

No entanto, os achados do presente estudo não corroboram com a literatura. Diaz et al (2020) observou em seu estudo que apenas as fêmeas apresentaram comportamento social prejudicado após a exposição pré-natal ao álcool no 12º dia de gestação. Enquanto Mooney e Varlinskaya (2011) demonstraram déficits sociais mais pronunciados na prole masculina. Diferenças relacionadas ao sexo nos efeitos da exposição pré-natal ao etanol no comportamento social foram relatadas anteriormente (Meyer e Riley, 1986). As diferenças metodológicas de exposição ao álcool e o delineamento

do teste de interação social pode ter relação com a variabilidade de resultados encontrados.

A função sensório-motora foi avaliada neste trabalho através do teste IPP que tem sido considerado um bom instrumento para avaliar o perfil cognitivo (Isolan et al., 2007). A IPP é classificada como um endofenótipo neurofisiológico (Greenwood et al., 2007). Sabe-se que essa função é severamente prejudicada na esquizofrenia, ou seja, há um déficit do processamento da informação nos indivíduos esquizofrênicos (Laurent et al., 1999). Zugno et al. (2017) verificaram que a prole adulta tratada com cetamina, cujas mães foram expostas ao tabagismo durante a gravidez demonstraram déficit no perfil sensório-motor, confirmando a validade da cetamina e os efeitos do estresse pré-natal na vida tardia da prole. O que está em desacordo com os resultados do presente estudo visto que a cetamina não demonstrou causar prejuízos na IPP em machos e fêmeas.

Entretanto, os machos submetidos apenas ao *binge* alcóolico pré-natal, demonstraram déficits de IPP na vida adulta quando comparados aos machos submetidos ao modelo animal de esquizofrenia com e sem estresse pré-natal. Crianças com FASD têm déficits significativos em todos os domínios da função executiva em comparação com os controles. O comprometimento substancial da função executiva global ocorre em crianças em todo o espectro, incluindo respostas de inibição, que é a capacidade de suprimir uma resposta (Mattson et al, 2019). Achados de neuroimagem também mostram padrões diferenciais de ativação regional em áreas importantes para o controle da inibição entre crianças com FASD (Ware et al., 2015; Kodali et al., 2017). Os resultados demonstram que os prejuízos da exposição pré-natal ao *binge* na função cognitiva foi persistente até a idade adulta.

Entretanto, os machos expostos ao *binge* pré-natal e a cetamina na idade adulta, não apresentaram déficit de IPP. Uma possibilidade alternativa é que o dano causado pela exposição ao álcool durante o neurodesenvolvimento ocorra porque a inibição dos receptores NMDA pelo álcool, pode resultar em um aumento compensatório dos níveis e/ou função do receptor NMDA, resultando em fluxo iônico excessivo através deste canal, que é

conhecido por desencadear toxicidade neuronal (Valenzuela et al, 2011). Estudos mostraram que déficits de aprendizagem de longa duração induzidos pelo álcool foram prevenidos pela administração de antagonistas do receptor NMDA durante a retirada da exposição a altos níveis de etanol em modelos de consumo de etanol equivalente ao terceiro trimestre, possivelmente por inibir o aumento compensatório dos receptores NMDA (Thomas et al., 2004; Lewis et al., 2007).

Os resultados do presente estudo evidenciam alterações comportamentais persistentes na vida adulta dos animais relacionadas a exposição ao *binge* alcóolico gestacional e ao modelo animal de esquizofrenia. O álcool é uma substância teratogênica e está associado a prejuízos no neurodesenvolvimento e psicopatologias mais tarde na vida da prole. No entanto, pouco se sabe sobre como a exposição pré-natal ao álcool influencia no desenvolvimento do cérebro. Todavia, estudos têm reforçado que os neurotransmissores estão alterados nos animais que foram expostos ao álcool (Valenzuela et al., 2011; Maaswinkel et al., 2013).

Pesquisadores tem observado que as alterações neuroquímicas observadas nos modelos animais, em especial, no sistema glutamatérgico, podem estar relacionadas com os distúrbios comportamentais e psicopatologias característicos deste transtorno (Maaswinkel et al., 2013). Os sistemas de neurotransmissores, especialmente os sistemas glutamatérgicos, GABAérgicos, dopaminérgicos e serotoninérgicos estão conectados e agem simultaneamente, podendo levar a um funcionamento aberrante de interneurônios que se manifesta como disfunção cognitiva, comportamental e social, através do funcionamento alterado de uma ampla gama de macro e microcircuitos (Yang e Tsai, 2017) e podem convergir para os sintomas positivos, negativos e cognitivos da esquizofrenia. Dados da literatura indicam que o ambiente intrauterino inadequado favorece a incidência de esquizofrenia na idade adulta (Brown e Patterson, 2012), e alterações neurobiológicas nos sistemas de neurotransmissores podem estar entre os mecanismos fisiopatológicos subjacentes aos transtorno (Keshavan et al., 2011).

Nesta perspectiva, o presente estudo observou níveis aumentados de serotonina e dopamina no estriado dos machos e níveis reduzidos de dopamina no estriado das fêmeas submetidos ao modelo animal de esquizofrenia induzido por cetamina, cujas mães foram expostas à um *binge* alcóolico no 11º dia de gestação. De fato, os sistemas neurotransmissores são reconhecidos como alvos importantes das ações desenvolvimentais do álcool. Efeitos de curto e longo prazo do álcool em neurotransmissores (como glutamato, dopamina e serotonina) foram demonstrados em modelos animais de FASD (Valenzuela et al., 2011) e os resultados do estudo demonstraram um efeito persistente do álcool na vida tardia destes animais.

Está bem descrito que a cetamina, um antagonista do receptor NMDA, é usada para fins anestésicos, terapêuticos e, ainda, como uma droga de abuso (Mehta et al., 2008). Evidências recentes sugerem que a cetamina pode não apenas afetar o sistema glutamatérgico, mas também atuar sobre os receptores nos sistemas dopaminérgico e serotoninérgico (Stahl, 2018), o que justifica ao menos em parte, as alterações nos níveis de dopamina e serotonina nos animais deste estudo cujas mães foram expostas ao *binge* alcóolico no 11º dia de gestação. Ademais, já foi demonstrado altas taxas de transtornos psiquiátricos na infância, adolescência e idade adulta de humanos expostos ao álcool durante o período pré-natal (Streissguth et al., 1991; Steinhausen et al., 1993;), incluindo a esquizofrenia (Slavney et al., 1978; Lohr e Bracha, 1989; Stoos et al., 2015).

Diante do exposto, observa-se que as consequências da exposição pré-natal ao álcool perduram por toda a vida do indivíduo. É de extrema relevância a compressão dos impactos na vida adulta, visto que o custo para a sociedade advém justamente dos efeitos de longo prazo (Georgieff, 2018) e os modelos animais desempenham um papel fundamental no estudo desses efeitos, pois a avaliação em humanos é limitada (Pei et al., 2011; Landgren et al., 2019).

6. CONCLUSÃO

Este estudo buscou auxiliar no avanço da compreensão dos fatores relacionados à fisiopatologia da esquizofrenia e as agressões ambientais no período pré-natal. Os resultados encontrados demonstraram que a exposição ao *binge* alcóolico no 11º dia de gestação, equivalente ao segundo trimestre de gestação em humanos, seguido do protocolo de indução à esquizofrenia utilizando a cetamina mostrou alterações comportamentais e neuroquímicas persistentes na idade adulta da prole, com diferenças entre os sexos. Observou-se, resumidamente, hiperlocomoção nas fêmeas e redução do *rearing* dos machos, aumento do tempo e número de contatos na interação social e o *binge* alcóolico sozinho demonstrou déficit cognitivo nos machos. Também foram observadas alterações nos níveis de neurotransmissores, com níveis elevados de serotonina e dopamina no estriado dos machos e níveis reduzidos de dopamina no estriado das fêmeas.

Diante disso, enfatiza-se que as consequências de agressões ambientais no período pré-natal perduram por toda a vida do indivíduo e o custo para a sociedade advém dos efeitos a longo prazo e levanta-se a necessidade de novos estudos que possam ajudar a compreender a natureza destes resultados. Outros parâmetros podem ser avaliados para compreender a diferença entre os sexos que foram visualizadas neste trabalho, como uma exploração da cascata de liberação da dopamina e serotonina, bem como a expressão de seus receptores pré e pós-sinápticos, para um melhor entendimento da participação do *binge* alcóolico durante o período gestacional e da cetamina na fisiopatologia da esquizofrenia.

REFERÊNCIAS

- Abi-Dargham A. Alterations of serotonin transmission in schizophrenia. *Int Rev Neurobiol.* 2007;78:133-64.
- Aghajanian GK, Marek GJ. Serotonin model of schizophrenia: emerging role of glutamate mechanisms. *Brain Res Brain Res Rev.* 2000;31(2-3):302-12.
- Alberry B, Laufer BI, Chater-Diehl E, Singh SM. Epigenetic Impacts of Early Life Stress in Fetal Alcohol Spectrum Disorders Shape the Neurodevelopmental Continuum. *Front Mol Neurosci.* 2021;14:671891.
- Almeida L, Andreu-Fernández V, Navarro-Tapia E, Aras-López R, Serra-Delgado M, Martínez L, García-Algar O, Gómez-Roig MD. Murine Models for the Study of Fetal Alcohol Spectrum Disorders: An Overview. *Front Pediatr.* 2020;15;8:359.
- Apa. “Diagnostic and Statistical Manual of Mental Diseases”. 5^a ed (APA). Washington DC: APA; 2013.
- Arfsten DP, Silbergeld EK, Loffredo CA. Fetal ADH2*3, maternal alcohol consumption, and fetal growth. *Int J Toxicol.* 2004 Jan-Feb;23(1):47-54
- Aubele T, Kritzer MF. Androgen influence on prefrontal dopamine systems in adult male rats: localization of cognate intracellular receptors in medial prefrontal projections to the ventral tegmental area and effects of gonadectomy and hormone replacement on glutamate-stimulated extracellular dopamine level. *Cereb Cortex.* 2012;22(8):1799-812.
- Baggio S, Mussulini BH, de Oliveira DL, Gerlai R, Rico EP. Embryonic alcohol exposure leading to social avoidance and altered anxiety responses in adult zebrafish. *Behav Brain Res.* 2018;352:62-69.
- Baggio S, Mussulini BH, de Oliveira DL, Zenki KC, Santos da Silva E, Rico EP. Embryonic alcohol exposure promotes long-term effects on cerebral glutamate transport of adult zebrafish. *Neurosci Lett.* 2017;636:265-269.
- Baggio S, Zenki K, Martins Silva A, Dos Santos TG, Rech G, Lazzarotto G, Dias RD, Mussulini BH, Rico EP, de Oliveira DL. Fetal alcohol spectrum disorders model alters the functionality of

glutamatergic neurotransmission in adult zebrafish. *Neurotoxicology*. 2020;78:152-160.

Balla A, Nattini Me, Sershen H, Lajtha A, Dunlop Ds, Javitt Dc. GABAB/ NMDA receptor interaction in the regulation of extracellular dopamine levels in rodent prefrontal cortex and striatum. *Neuropharmacology*. 2009;56(5):915-21.

Becker A, Grecksch G. Ketamine-induced changes in rat behaviour: a possible animal model of schizophrenia. Test of predictive validity. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2004;28(8):1267-77.

Boison D, Singer P, Shen HY, Feldon J, Yee BK. Adenosine hypothesis of schizophrenia--opportunities for pharmacotherapy. *Neuropharmacology*. 2012; 62(3):1527-43.

Bookstein FL, Streissguth AP, Sampson PD, Connor PD, Barr HM. Corpus callosum shape and neuropsychological deficits in adult males with heavy fetal alcohol exposure. *Neuroimage*. 2002;15(1):233-51.

Bressan RA, Pilowsky I. S. Hipótese glutamatérgica da esquizofrenia. *Rev Bras Psiquiatr*. 2003;25(3):177-83.

Brown AS, Patterson PH. *The Origins of Schizophrenia*. New York: Columbia University Press, 2012.

Brown AS. Epidemiologic studies of exposure to prenatal infection and risk of schizophrenia and autism. *Dev Neurobiol*. 2012;72(10):1272-1276.

Brown AS. The environment and susceptibility to schizophrenia. *Prog Neurobiol*. 2011;93(1):23-58.

Canever L, Oliveira L, D'altoe De Luca R, Correa PT, De BFD, Matos MP, Scaini G, Quevedo J, Streck EL, Zugno AI. A rodent model of schizophrenia reveals increase in creatine kinase activity with associated behavior changes. *Oxid Med Cell Longev*. 2010;3(6):421-7.

Catts VS, Fung SJ, Long LE, Joshi D, Vercammen A, Allen KM, Fillman SG, Rothmond DA, Sinclair D, Tiwari Y, Tsai SY, Weickert TW, Shannon Weickert C. Rethinking schizophrenia in the context of normal neurodevelopment. *Front Cell Neurosci*. 2013;7:60.

- Chatterjee M, Verma R, Ganguly S, Palit G. Neurochemical and molecular characterization of ketamine-induced experimental psychosis model in mice. *Neuropharmacology*. 2012;63(6):1161-71.
- Chien MF, Huang CC, Kusano T, Endo G. Facilities for transcription and mobilization of an exon-less bacterial group II intron nested in transposon TnMERI1. *Gene*. 2008;408(1-2):164-71.
- Clark BJ, Hamilton DA, Wishaw IQ. Motor activity (exploration) and formation of home bases in mice (C57BL/6) influenced by visual and tactile cues: modification of movement distribution, distance, location, and speed. *Physiology & behavior*. 2006;87(4):805–816.
- Coleman LG, Oguz I, Lee J, Styner M, Crews FT. Postnatal day 7 ethanol treatment causes persistent reductions in adult mouse brain volume and cortical neurons with sex specific effects on neurogenesis. *Alcohol*. 2012;46:603–12.
- Daskalakis NP, Bagot RC, Parker KJ, Vinkers CH, de Kloet ER. The three-hit concept of vulnerability and resilience: Towards understanding adaptation to early-life adversity outcomes. *Psychoneuroendocrinology*. 2013;38:1858–1873.
- Davis KL, Kahn RS, Ko G, Davidson M. Dopamine in schizophrenia: a review and reconceptualization. *Am J Psychiatry*. 1991 Nov;148(11):1474-86.
- De Benedetto GE, Fico D, Pennetta A, Malitesta C, Nicolardi G, Lofrumento DD, De Nuccio F, La Pesa V. A rapid and simple method for the determination of 3,4-dihydroxyphenylacetic acid, norepinephrine, dopamine, and serotonin in mouse brain homogenate by HPLC with fluorimetric detection. *J Pharm Biomed Anal*. 2014;98:266-70.
- De Oliveira L, Spiazzi CM, Bortolin T, Canever L, Petronilho F, Mina FG, Dal-Pizzol F, Quevedo J, Zugno AI. Different sub-anesthetic doses of ketamine increase oxidative stress in the brain of rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2009;33(6):1003-8.
- de Olmos S, Bueno A, Bender C, Lorenzo A, de Olmos J. Sex differences and influence of gonadal hormones on MK801-

- induced neuronal degeneration in the granular retrosplenial cortex of the rat. *Brain Struct Funct.* 2008;213(1-2):229-38.
- Diaz MR, Johnson JM, Varlinskaya EI. Increased ethanol intake is associated with social anxiety in offspring exposed to ethanol on gestational day 12. *Behav Brain Res.* 2020;393:112766.
- Dicicco-Bloom E, Lord C, Zwaigenbaum L, Courchesne E, Dager SR, Schmitz C, Schultz RT, Crawley J, Young LJ. The developmental neurobiology of autism spectrum disorder. *J Neurosci.* 2006;26(26):6897-906.
- Dilworth MR, Kusinski LC, Baker BC, Renshall LJ, Greenwood SL, Sibley CP, Wareing M. Defining fetal growth restriction in mice: A standardized and clinically relevant approach. *Placenta.* 2011;32(11):914-6.
- Dodge NC, Thomas KGF, Meintjes EM, Molteno CD, Jacobson JL, Jacobson SW. Reduced Hippocampal Volumes Partially Mediate Effects of Prenatal Alcohol Exposure on Spatial Navigation on a Virtual Water Maze Task in Children. *Alcohol Clin Exp Res.* 2020;44(4):844-855.
- Driscoll CD, Streissguth AP, Riley EP. Prenatal alcohol exposure: comparability of effects in humans and animal models. *Neurotoxicol Teratol.* 1990;12(3):231-7.
- Dursun I, Jakubowska-Doğru E, Uzbay T. Effects of prenatal exposure to alcohol on activity, anxiety, motor coordination, and memory in young adult Wistar rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 2006;85(2):345-55.
- Famy C, Streissguth AP, Unis AS. Mental illness in adults with fetal alcohol syndrome or fetal alcohol effects. *Am J Psychiatry.* 1998;155(4):552-4.
- Farde L. Antipsychotic occupancy of dopamine receptors in schizophrenia. *CNS Neurosci Ther.* 2011;17(2):97-103.
- Fatemi SH, Folsom TD. The neurodevelopmental hypothesis of schizophrenia, revisited. *Schizophr Bull.* 2009;35(3):528-548.
- Frohlich J, Van Hom JD. Reviewing ketamine model for schizophrenia. *J Psychopharmacol.* 2014;28(4):287-302.
- Fryer SL, McGee CL, Matt GE, Riley EP, Mattson SN. Evaluation of psychopathological conditions in children with heavy prenatal alcohol exposure. *Pediatrics.* 2007;119(3):e733-41.

- Fuster JM. The prefrontal cortex—an update: time is of the essence. *Neuron*. 2001;30(2):319–33.
- Gama CS, Canever L, Panizzutti B, Gubert C, Stertz L, Massuda R, Pedrini M, de Lucena DF, Luca RD, Fraga DB, Heylmann AS, Deroza PF, Zugno AI. Effects of omega-3 dietary supplement in prevention of positive, negative and cognitive symptoms: a study in adolescent rats with ketamine-induced model of schizophrenia. *Schizophr Res*. 2012;141(2-3):162-7.
- Georgieff MK, Tran PV, Carlson ES. Atypical fetal development: Fetal alcohol syndrome, nutritional deprivation, teratogens, and risk for neurodevelopmental disorders and psychopathology. *Dev Psychopathol*. 2018;30(3):1063-1086.
- Gould E, Westlind-Danielsson A, Frankfurt M, McEwen BS. Sex differences and thyroid hormone sensitivity of hippocampal pyramidal cells. *J Neurosci*. 1990;10(3):996-1003.
- Gould E, Woolley CS, Frankfurt M, McEwen BS. Gonadal steroids regulate dendritic spine density in hippocampal pyramidal cells in adulthood. *J Neurosci*. 1990;10:1286–1291.
- Graeff FG, Brandão ML. *Neurobiologia das Doenças Mentais*. 5.ed (Lemos). São Paulo: Lemos; 1999.
- Greenwood TA, Braff DL, Light GA, Cadenhead KS, Calkins ME, Dobie DJ, Freedman R, Green MF, Gur RE, Gur RC, Mintz J, Nuechterlein KH, Olincy A, Radant AD, Seidman LJ, Siever LJ, Silverman JM, Stone WS, Swerdlow NR, Tsuang DW, Tsuang MT, Turetsky BI, Schork NJ. Initial heritability analyses of endophenotypic measures for schizophrenia: the consortium on the genetics of schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry*. 2007;64(11):1242-50.
- Hajszan T, MacLusky NJ, Leranth C. Role of androgens and the androgen receptor in remodeling of spine synapses in limbic brain areas. *Horm Behav*. 2008;53(5):638-46.
- Hamilton DA, Magcalas CM, Barto D, Bird CW, Rodriguez CI, Fink BC, Pellis SM, Davies S, Savage DD. Moderate prenatal alcohol exposure and quantification of social behavior in adult rats. *J Vis Exp*. 2014;(94):52407.

- Harrison PJ, Weinberger DR. Schizophrenia genes, gene expression, and neuropathology: on the matter of their convergence. *Mol Psychiatry*. 2005;10(1):40-68.
- Hensch TK. Critical period regulation. *Annu Rev Neurosci*. 2004;27:549-79.
- Heylmann ASA, Canever L, Gress K, Gomes ST, Fachim I, Michels C, Stopassoli GC, Mastella GA, Steckert AV, Damiani AP, de Andrade VM, Quevedo J, Zugno AI. Pre-clinical investigation of Diabetes Mellitus as a risk factor for schizophrenia. *Behav Brain Res*. 2017;326:154-164.
- Hietala J, Syvälahti E, Vuorio K, Rääköläinen V, Bergman J, Haaparanta M. Presynaptic dopamine function in striatum of neuroleptic-naïve schizophrenic patients. *Lancet* 1995;346:1130.
- Howes OD, Kambeitz J, Kim E, Stahl D, Slifstein M, Abi-Dargham A. The nature of dopamine dysfunction in schizophrenia and what this means for treatment: meta-analysis of imaging studies. *Arch Gen Psychiatry*. 2012;69:776-786.
- Howland JG, Czakoff BN, Zhang Y. Altered object-in-place recognition memory, prepulse inhibition, and locomotor activity in the offspring of rats exposed to a viral mimetic during pregnancy. *Neuroscience*. 2012;201:184-98.
- Hrovatin K, Kunej T, Dolžan V. Genetic variability of serotonin pathway associated with schizophrenia onset, progression, and treatment. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2020;183(2):113-127.
- Hunt MJ, Raynaud B, Garcia R. Ketamine dose-dependently induces high-frequency oscillations in the nucleus accumbens in freely moving rats. *Biol Psychiatry*. 2006;60(11):1206-14.
- Ikonomidou C, Bittigau P, Ishimaru MJ, Wozniak DF, Koch C, Genz K, Price MT, Stefovská V, Hörster F, Tenkova T, Dikranian K, Olney JW. Ethanol-induced apoptotic neurodegeneration and fetal alcohol syndrome. *Science*. 2000.287(5455):1056-60.
- Insel TR. Rethinking schizophrenia. *Nature*. 2010;468(7321):187-193.
- Isolan L, Pheula G, Salum GA Jr, Oswald S, Rohde LA, Manfro GG. An open-label trial of escitalopram in children and

- adolescents with social anxiety disorder. *J Child Adolesc Psychopharmacol*. 2007;17(6):751-60.
- Javitt DC. Glutamatergic theories of schizophrenia. *Isr J Psychiatry Relat Sci*. 2010;47(1):4-16.
- Johnstone EVEC, Frith CD, Kreef L. Schizophrenia ment emerges principally in those items in the battery. *The Lancet*. 1976;2(7992):924–926.
- Joyce EM, Roiser JP. Cognitive heterogeneity in schizophrenia. *Curr Opin Psychiatry*. 2007;20(3):268-272.
- Kajimoto K, Allan A, Cunningham LA. Fate analysis of adult hippocampal progenitors in a murine model of fetal alcohol spectrum disorder (FASD). *PLoS ONE*. 2013;8:e73788.
- Kantrowitz JT, Javitt DC. Thinking glutamatergically: changing concepts of schizophrenia based upon changing neurochemical models. *Clin Schizophr Relat Psychoses*. 2010;4(3):189-200.
- Kaplan HI, Sadock BJ, editores. *Compêndio de Psiquiatria Clínica: Ciências do Comportamento e Psiquiatria Clínica*. 11ª edição. Porto Alegre: Artmed; 2017.
- Kapur S, Mamo D. Half a century of antipsychotics and still a central role for dopamine D2 receptors. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2003;27(7):1081-90.
- Kapur S, Remington G. Serotonin-dopamine interaction and its relevance to schizophrenia. *Am J Psychiatry*. 1996;153(4):466-76.
- Kapur S, Seeman P. NMDA receptor antagonists ketamine and PCP have direct effects on the dopamine D(2) and serotonin 5-HT(2) receptors- implications for models of schizophrenia. *Mol psychiatry*. 2002;7(8):837–844.
- Karacay B, Mahoney J, Plume J, Bonthius DJ. Genetic absence of nNOS worsens fetal alcohol effects in mice. II: microencephaly and neuronal losses. *Alcohol Clin Exp Res*. 2015;39:221–31.
- Katzung BG, Trevor AJ, organizadores. *Farmacologia básica e clínica*. 13ª edição. Porto Alegre: McGraw-Hill; 2017.
- Kelly SJ, Pierce DR, West JR. Microencephaly and hyperactivity in adult rats may be caused by neonatal exposure to high-temperature blood alcohol. *Exp Neurol*. 1987;96:580-93.

- Keshavan MS, Nasrallah HA, Tandon R. Schizophrenia, "Just the Facts" 6. Moving ahead with the schizophrenia concept: from the elephant to the mouse. *Schizophr Res.* 2011;127(1-3):3-13.
- Khashan AS, Abel KM, McNamee R, Pedersen MG, Webb RT, Baker PN, Kenny LC, Mortensen PB. Higher risk of offspring schizophrenia following antenatal maternal exposure to severe adverse life events. *Arch Gen Psychiatry.* 2008;65(2):146-52
- Kinkead B, Selz KA, Owens MJ, Mandell AJ. Algorithmically designed peptides ameliorate behavioral defects in animal model of ADHD by an allosteric mechanism. *J Neurosci Methods.* 2006;151(1):68-81.
- Kodali VN, Jacobson JL, Lindinger NM, Dodge NC, Molteno CD, Meintjes EM, Jacobson SW. Differential recruitment of brain regions during response inhibition in children prenatally exposed to alcohol. *Alcohol Clin Exp Res.* 2017;41:334–344.
- Koyama S, Sakurai T, Nakahara T, Miyakoshi J. Extremely low frequency (ELF) magnetic fields enhance chemically induced formation of apurinic/aprimidinic (AP) sites in A172 cells. *Int J Radiat Biol.* 2008;84(1):53-9.
- Landgren V, Svensson L, Gyllencreutz E, Aring E, Grönlund MA, Landgren M. Fetal alcohol spectrum disorders from childhood to adulthood: a Swedish population-based naturalistic cohort study of adoptees from Eastern Europe. *BMJ Open.* 2019;9(10):e032407.
- Lara DR, Dall'igna OP, Ghisolfi ES, Brunstein MG. Involvement of adenosine in the neurobiology of schizophrenia and its therapeutic implications. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2006;30(4):617-29.
- Laurent A, Saoud M, Bougerol T, d'Amato T, Anchisi AM, Biloa-Tang M, Dalery J, Rochet T. Attentional deficits in patients with schizophrenia and in their non-psychotic first-degree relatives. *Psychiatry Res.* 1999;89:147–159.
- Leucht C, Heres S, Kane JM, Kissling W, Davis JM, Leucht S. Oral versus depot antipsychotic drugs for schizophrenia—a critical systematic review and meta-analysis of randomised long-term trials. *Schizophr Res.* 2011;127(1-3):83-92.
- Lewandowski KE, Cohen BM, Ongur D. Evolution of neuropsychological dysfunction during the course of

- schizophrenia and bipolar disorder. *Psychol Med.* 2011;41(2):225-241.
- Lewis B, Wellmann KA, Barron S. Agmatine reduces balance deficits in a rat model of third trimester binge-like ethanol exposure. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior.* 2007;88:114–121.
- Lieberman JA, Perkins D, Belger A, Chakos M, Jarskog F, Boteva K, Gilmore J. The early stages of schizophrenia: speculations on pathogenesis, pathophysiology, and therapeutic approaches. *Biol Psychiatry.* 2001;50(11):884-97.
- Lipinski RJ, Hammond P, O'Leary-Moore SK, Ament JJ, Pecevich SJ, Jiang Y, Budin F, Parnell SE, Suttie M, Godin EA, Everson JL, Dehart DB, Oguz I, Holloway HT, Styner MA, Johnson GA, Sulik KK. Ethanol-induced face-brain dysmorphology patterns are correlative and exposure-stage dependent. *PLoS One.* 2012;7(8):e43067.
- Locklear MN, Cohen AB, Jone A, Kritzer MF. Sex Differences Distinguish Intracortical Glutamate Receptor-Mediated Regulation of Extracellular Dopamine Levels in the Prefrontal Cortex of Adult Rats. *Cereb Cortex.* 2016; 26(2):599-610.
- Lodge DJ, Grace AA. Hippocampal dysregulation of dopamine system function and the pathophysiology of schizophrenia. *Trends Pharmacol Sci.* 2011;32(9):507–513, 2011.
- Lohr JB, Bracha HS. Can schizophrenia be related to prenatal exposure to alcohol? Some speculations. *Schizophr Bull.* 1989;15(4):595-603.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193(1):265-75.
- Maaswinkel H, Zhu L, Weng W. Assessing social engagement in heterogeneous groups of zebrafish: a new paradigm for autism-like behavioral responses. *PLoS One.* 2013 Oct 8;8(10):e75955.
- Mansbach RS, Geyer MA, Braff DL. Dopaminergic stimulation disrupts sensorimotor gating in the rat. *Psychopharmacology.* 1988;94(4):507-14.
- Marsman A, Van Den Heuvel MP, Klomp DW, Kahn RS, Luijten PR, Hulshoff Pol HE. Glutamate in schizophrenia: a focused

- review and meta-analysis of (1)H-MRS studies. *Schizophr Bull.* 2013;39(1):120-9.
- Masters S, Trevor A. *Farmacologia básica e clínica.* Rio de Janeiro: AMGH. 2017.
- Mattson SN, Bernes GA, Doyle LR. Fetal Alcohol Spectrum Disorders: A Review of the Neurobehavioral Deficits Associated With Prenatal Alcohol Exposure. *Alcohol Clin Exp Res.* 2019;43(6):1046-1062.
- Mattson SN, Bernes GA, Doyle LR. Fetal Alcohol Spectrum Disorders: A Review of the Neurobehavioral Deficits Associated With Prenatal Alcohol Exposure. *Alcohol Clin Exp Res.* 2019;43(6):1046-1062.
- McGrath JJ, Eyles DW, Pedersen CB, Anderson C, Ko P, Burne TH, Norgaard-Pedersen B, Hougaard DM, Mortensen PB. Neonatal vitamin D status and risk of schizophrenia: a population-based case-control study. *Arch Gen Psychiatry.* 2010;67(9):889-94.
- Mehta SH, Morgan JC, Sethi KD. Sleep disorders associated with Parkinson's disease: role of dopamine, epidemiology, and clinical scales of assessment. *CNS Spectr.* 2008;13:6–11.
- Mendell AL, Atwi S, Bailey CD, McCloskey D, Scharfman HE, MacLusky NJ. Expansion of mossy fibers and CA3 apical dendritic length accompanies the fall in dendritic spine density after gonadectomy in male, but not female, rats. *Brain Struct Funct.* 2017;222(1):587-601.
- Meyer LS, Riley EP. Social play in juvenile rats prenatally exposed to alcohol. *Teratol.* 1986;34:1–7.
- Meyer U, Feldon J. Epidemiology-driven neurodevelopmental animal models of schizophrenia. *Prog Neurobiol.* 2010;90(3):285-326.
- Meyer U, Schwarz MJ, Müller N. Inflammatory processes in schizophrenia: A promising neuroimmunological target for the treatment of negative/cognitive symptoms and beyond. *Pharmacol Ther.* 2011;132(1):96–110.
- Meyer-Lindenberg A, Miletich RS, Kohn PD, Esposito G, Carson RE, Quarantelli M, Weinberger DR, Berman KF. Reduced

prefrontal activity predicts exaggerated striatal dopaminergic function in schizophrenia. *Nat Neurosci.* 2002;5(3):267-71.

Micallef J, Tardieu S, Gentile S, Fakra E, Jouve E, Sambuc R, Blin O. Effects of a subanaesthetic dose of ketamine on emotional and behavioral state in healthy subjects. *Neurophysiol Clin.* 2003;33(3):138-47.

Middleton FA, Varlinskaya EI, Mooney SM. Molecular substrates of social avoidance seen following prenatal ethanol exposure and its reversal by social enrichment. *Dev Neurosci.* 2012;34(2-3):115-28.

Miyamoto S, Lamantia AS, Duncan GE, Sullivan P, Gilmore JH, Lieberman JA. Recent advances in the neurobiology of schizophrenia. *Mol Interv.* 2003;3(1):27-39.

Monte AS, de Souza GC, McIntyre RS, Soczynska JK, dos Santos JV, Cordeiro RC, Ribeiro BM, de Lucena DF, Vasconcelos SM, de Sousa FC, Carvalho AF, Macêdo DS. Prevention and reversal of ketamine-induced schizophrenia related behavior by minocycline in mice: Possible involvement of antioxidant and nitergic pathways. *J of psychopharmacol.* 2013;27(11):1032– 43.

Mooney SM, Varlinskaya EI. Acute prenatal exposure to ethanol and social behavior: effects of age, sex, and timing of exposure. *Behav Brain Res.* 2011;216(1):358-64.

Morton RA, Diaz MR, Topper LA, Valenzuela CF. Construction of vapor chambers used to expose mice to alcohol during the equivalent of all three trimesters of human development. *J Vis Exp.* 2014;89:51839.

Neill JC, Harte MK, Haddad PM, Lydall ES, Dwyer DM. Acute and chronic effects of NMDA receptor antagonists in rodents, relevance to negative symptoms of schizophrenia: a translational link to humans. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2014;24(5):822-35.

NIAAA. “National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism”. O conselho do NIAAA aprova a definição de consumo excessivo de álcool. *Boletim NIAAA 3 (NIAAA) Bethesda MD: NIAAA; 2004.*

Niesink RJ, Van Ree JM. Involvement of opioid and dopaminergic systems in isolation-induced pinning and social grooming of young rats. *Neuropharmacology.* 1989;28(4):411-8.

- Nirgudkar P, Taylor DH, Yanagawa Y, Valenzuela CF. Ethanol exposure during development reduces GABAergic/glycinergic neuron numbers and lobule volumes in the mouse cerebellar vermis. *Neurosci Lett*. 2016; 632:86–91.
- Obeso JA1, Merello M, Rodríguez-Oroz MC, Marin C, Guridi J, Alvarez L. Levodopa-induced dyskinesias in Parkinson's disease. *Handb Clin Neurol*. 2007;84:185-218.
- O'Connor MJ, Paley B. The relationship of prenatal alcohol exposure and the postnatal environment to child depressive symptoms. *J Psychiatr Psychol*. 2006;31(1):50-64.
- Osterlund Oltmanns JR, Schaeffer EA, Goncalves Garcia M, Donaldson TN, Acosta G, Sanchez LM, Davies S, Savage DD, Wallace DG, Clark BJ. Sexually dimorphic organization of open field behavior following moderate prenatal alcohol exposure. *Alcohol Clin Exp Res*. 2022;46(5):861-875.
- Owen MJ, Sawa A, Mortensen PB. Esquizofrenia. *Lancet*. 2016;388(10039):86-97.
- Parnell SE, Holloway HE, Baker LK, Styner MA, Sulik KK. Dymorphogenic effects of first trimester-equivalent ethanol exposure in mice: a magnetic resonance microscopy-based study. *Alcohol Clin Exp Res*. 2014;38:2008–14.
- Patten AR, Fontaine CJ, Christie BR. A comparison of the different animal models of fetal alcohol spectrum disorders and their use in studying complex behaviors. *Front Psychiatr*. 2014;2:93.
- Pei J, Denys K, Hughes J, Rasmussen C. Mental health issues in fetal alcohol spectrum disorder. *J Ment Health*. 2011;20(5):438-48.
- Petrelli B, Weinberg J, Hicks GG. Effects of prenatal alcohol exposure (PAE): insights into FASD using mouse models of PAE. *Biochem Cell Biol*. 2018;96(2):131-147.
- Pickard B. Progress in defining the biological causes of schizophrenia. *Expert Rev Mol Med*. 2011;13:e25.
- Poels EM, Kegeles LS, Kantrowitz JT, Javitt DC, Lieberman JA, Abi-Dargham A, Girgis RR. Glutamatergic abnormalities in schizophrenia: a review of proton MRS findings. *Schizophr Res*. 2014;152(2-3):325-32.

- 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. *Lancet Glob Health*. 2017;5(3):e290-e299.
- Reddy RD, Yao JK. Free radical pathology in schizophrenia: a review. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 1996;55(1-2):33-43.
- Salgado JV, Hetem LA, Sandner G. Modelos experimentais de esquizofrenia – uma revisão Experimental models of schizophrenia – a review. *Rev Bras Psiquiatr*. 2006;28(2):135–141.
- Salum C, Raisman-Vozari R, Michel PP, Zanardo Gomes M, Mitkovski M, Ferrario JE, Ginestet L, Del Bel EA. Modulation of dopamine uptake by nitric oxide in cultured mesencephalic neurons. *Brain Res*. 2008;1198:27–33.
- Sams-Dodd F. Effects of continuous D-amphetamine and phencyclidine administration on social behaviour, stereotyped behaviour, and locomotor activity in rats. *Neuropsychopharmacology*. 1998;9(1):18–25.
- Schneider T, Przewlocki R. Behavioral alterations in rats prenatally exposed to valproic acid: animal model of autism. *Neuropsychopharmacology*. 2005;30(1):80-9.
- Schneider T, Przewlocki R. Behavioral alterations in rats prenatally exposed to valproic acid: animal model of autism. *Neuropsychopharmacology*. 2005;30(1):80-9.
- Sesack SR, Carr DB. Selective prefrontal cortex inputs to dopamine cells: implications for schizophrenia. *Physiol Behav*. 2002;77(4-5):513-7.
- Shamsi S, Lau A, Lencz T, Burdick KE, DeRosse P, Brenner R, Lindenmayer JP, Malhotra AK. Cognitive and symptomatic predictors of functional disability in schizophrenia. *Schizophr Res*. 2011;126:257–64.
- Slavney PR, Grau JG. Fetal alcohol damage and schizophrenia. *J Clin Psychiatry*. 1978;39(10):782-783.
- Smith CC, McMahon LL. Estradiol-induced increase in the magnitude of long-term potentiation is prevented by blocking NR2B-containing receptors. *J Neurosci*. 2006;26(33):8517-22.

- Smith T, Weston C, Lieberman J. Schizophrenia (maintenance treatment). *Am Fam Physician*. 2010;82(4):338-9.
- Stahl SM. Beyond the dopamine hypothesis of schizophrenia to three neural networks of psychosis: dopamine, serotonin, and glutamate. *CNS Spectr*. 2018;23(3):187-191.
- Steinhausen HC, Willms J, Spohr HL. Long-term psychopathological and cognitive outcome of children with fetal alcohol syndrome. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 1993;32(5):990-4.
- Stoos C, Nelsen L, Schissler KA, Elliott AJ, Kinney HC. Fetal alcohol syndrome and secondary schizophrenia: a unique neuropathologic study. *J Child Neurol*. 2015;30(5):601-605.
- Streissguth AP, Aase JM, Clarren SK, Randels SP, LaDue RA, Smith DF. Síndrome alcoólica fetal em adolescentes e adultos. *Jama*. 1991;265(15):1961-1967.
- Streissguth AP, Aase JM, Clarren SK, Randels SP, LaDue RA, Smith DF. Fetal alcohol syndrome in adolescents and adults. *JAMA*. 1991;265:1961-1967.
- Sulik KK, Johnston MC. Sequence of developmental alterations following acute ethanol exposure in mice: craniofacial features of the fetal alcohol syndrome. *Am J Anat*. 1983;166:257-69.
- Taherianfard M, Sharifi M, Tadjali M, Kohkiloezadeh M. Modulation of NR1 subunit of N-methyl-D-aspartate receptor by ovariectomy and passive avoidance learning. *Iran J Neurol*. 2012;11(4):140-5.
- Tajima K, Fernandez H, Lopez-Ibor JL, Carrasco JL, Diaz-Marsa M. Schizophrenia treatment. Critical review on the drugs and mechanisms of action of antipsychotics. *Actas Esp Psiquiatr*. 2009;37(6):330-42.
- Tannenholz L, Jimenez JC, Kheirbek MA. Local and regional heterogeneity underlying hippocampal modulation of cognition and mood. *Front Behav Neurosci*. 2014;8:147.
- Thomas JD, Garcia GG, Dominguez HD, Riley EP. Administration of eliprodil during ethanol withdrawal in the neonatal rat attenuates ethanol-induced learning deficits. *Psychopharmacology*. 2004;175:189-195.

- Thompson SM, Berkowitz LE, Clark BJ. Behavioral and neural subsystems of rodent exploration. *Learning and Motivation*. 2018; 61:3–15.
- Tran TD, Cronise K, Marino MD, Jenkins WJ, Kelly SJ. Critical periods for the effects of alcohol exposure on brain weight, body weight, activity and investigation. *Behav Brain Res*. 2000;116(1):99-110.
- Tsuchie K, Miyaoka T, Furuya M, Liaury K, Ieda M, Wake R, Horiguchi J, Takechi M. The effects of antipsychotics on behavioral abnormalities of the Gunn rat (unconjugated hyperbilirubinemia rat), a rat model of schizophrenia. *Asian J Psychiatr*. 2013;6(2):119-23.
- Tunc-Ozcan E, Ullmann TM, Shukla PK, Redei EE. Low-dose thyroxine attenuates autism-associated adverse effects of fetal alcohol in male offspring's social behavior and hippocampal gene expression. *Alcohol Clin Exp Res*. 2013;37(11):1986-95.
- Valenzuela CF, Puglia MP, Zucca S. Focus on: neurotransmitter systems. *Alcohol Res Health*. 2011;34(1):106-20.
- Van Den Buuse M. Modeling the positive symptoms of schizophrenia in genetically modified mice: Pharmacology and methodology aspects. *Schizophr Bull*. 2010;36(2):246–270.
- Van Os J, Kenis G, Rutten BP. The environment and schizophrenia. *Nature*. 2010;468(7321):203-12.
- Varlinskaya EI, Mooney SM. Acute exposure to ethanol on gestational day 15 affects social motivation of female offspring. *Behav Brain Res*. 2014;261:106-9.
- Vedder LC, Smith CC, Flannigan AE, McMahon LL. Estradiol-induced increase in novel object recognition requires hippocampal NR2B-containing NMDA receptors. *Hippocampus*. 2013;23(1):108-15.
- Velligan DI, Rao S. The Epidemiology and Global Burden of Schizophrenia. *J Clin Psychiatry*. 2023;84(1):MS21078COM5.
- Wang AL, Micov VB, Kwarteng F, Wang R, Hausknecht KA, Oubraim S, Haj-Dahmane S, Shen RY. Prenatal ethanol exposure leads to persistent anxiety-like behavior during adulthood indicated by reduced horizontal and vertical exploratory behaviors. *Front Neurosci*. 2023;17:1163575.

- Ware AL, Infante MA, O'Brien JW, Tapert SF, Jones KL, Riley EP, Mattson SN. An fMRI study of behavioral response inhibition in adolescents with and without histories of heavy prenatal alcohol exposure. *Behav Brain Res.* 2015;278:137–146.
- Weiss IC, Feldon J. Environmental animal models for sensorimotor gating deficiencies in schizophrenia: a review. *Psychopharmacology.* 2001;156(2-3):305-26.
- WHO. Global status report on alcohol and health 2018. Genève, 2018;1-472
- Wieczorek L, Fish EW, O'Leary-Moore SK, Parnell SE, Sulik KK. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis and behavioral dysfunction following early binge-like prenatal alcohol exposure in mice. *Alcohol.* 2015;49(3):207-17.
- Wilson DA, Masiello K, Lewin MP, Hui M, Smiley JF, Saito M. Developmental ethanol exposure-induced sleep fragmentation predicts adult cognitive impairment. *Neuroscience.* 2016;322:18–27.
- Yang AC, Tsai SJ. New Targets for Schizophrenia Treatment beyond the Dopamine Hypothesis. *Int J Mol Sci.* 2017;18(8):1689.
- Zelner I, Koren G. Pharmacokinetics of ethanol in the maternal-fetal unit. *Can J Clin Pharmacol.* 2013;20(3):259-265.
- Zhang Y, Cazakoff BN, Thai CA, Howland JG. Prenatal exposure to a viral mimetic alters behavioural flexibility in male, but not female, rats. *Neuropharmacology.* 2012;62(3):1299-307.
- Zugno AI, Canever L, Heylmann AS, Wessler PG, Steckert A, Mastella GA, de Oliveira MB, Damázio LS, Pacheco FD, Calixto OP, Pereira FP, Macan TP, Pedro TH, Schuck PF, Quevedo J, Budni J. Effect of folic acid on oxidative stress and behavioral changes in the animal model of schizophrenia induced by ketamine. *J Psychiatr Res.* 2016;81:23-35.
- Zugno AI, de Miranda IM, Budni J, Volpato AM, Luca RD, Deroza PF, de Oliveira MB, Heylmann AS, da Rosa Silveira F, Wessler P, Antunes Mastella G, Cipriano AL, Quevedo J. Effect of maternal deprivation on acetylcholinesterase activity and behavioral changes on the ketamine-induced animal model of schizophrenia. *Neuroscience.* 2013b;248:252-60.

Zugno AI, Fraga DB, De Luca RD, Ghedim FV, Deroza PF, Cipriano AL, Oliveira MB, Heylmann AS, Budni J, Souza RP, Quevedo J. Chronic exposure to cigarette smoke during gestation results in altered cholinesterase enzyme activity and behavioral deficits in adult rat offspring: potential relevance to schizophrenia. *J Psychiatr Res.* 2013a;47(6):740-6.

Zugno AI, Oliveira MB, Mastella GA, Heylmann AS, Canever L, Pacheco FD, Damazio LS, Citadin SA, de Lucca LA, Simões LR, Malgarin F, Budni J, Barichello T, Schuck PF, Quevedo J. Increased risk of developing schizophrenia in animals exposed to cigarette smoke during the gestational period. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2017;75:199-206.

ANEXO A – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO PELO CEUA



Universidade do Extremo Sul Catarinense
Comissão de Ética no Uso de Animais



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto abaixo especificado, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA da Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC, em reunião de **08/03/2022**.

Título do projeto	Efeitos comportamentais e moleculares da exposição ao álcool no segundo trimestre de gestação em ratas Wistar e a sua prole e a relação com a esquizofrenia.
Project title	Behavioral and molecular effects of alcohol exposure in the second trimester of pregnancy in female Wistar rats and their offspring and the relationship with schizophrenia
Número do protocolo Protocol number	09/2022
Pesquisador principal Principal Investigator	ALEXANDRA IOPPI ZUGNO
Pesquisadores Researchers	Amanda Kunz de Godoi, Ana Luísa Schmidt Ferreira, Carla Sehnem Bortolotto, Gustavo Beltrame, Heloísy Serafim, Isabela Hübbe de Oliveira, Larissa Ribeiro de Souza, Louyse Sulzbach Damazio, Maria Eduarda Scheeren Xavier, Marina Tonello, Murilo Oliveira de Carvalho, Natália Boschetti, Nicole Bento de Oliveira, Nicole Luiza Rizzotto, Pamela Soares de melo, Paulo Otávio Hilário Pinter, Pedro Garcia Lemes Proença, Eduardo Pacheco Rico.

Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência da autorização	10/03/2022 a 31/07/2023
Espécie/linhagem/raça	Rato heterogênico / Wistar
Idade/Peso	60 dias / 100-350g
Número de animais	Feminino = 24
Espécie/linhagem/raça	Rato heterogênico / Wistar
Idade/Peso	30 dias / 100-350g
Número de animais	Feminino = 48 + Masculino = 48
Total	120
Procedência	Biotério UNESC

The Ethics Committee on Animal Use on Research, sanctioned by the resolution number 03/2017/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794/08, has analyzed the Project that was Approved in its ethical and methodological aspects. Any alteration of the original version of this project must be previously submitted to the Committee for further analyzes. May you have further questions, please contact us by e-mail ceua@unesc.net.

Josiane Budni
Josiane Budni

Coordenadora da CEUA

Criciúma-SC, 08 de março de 2022.