



Fundação Universidade Federal do ABC

Pró reitoria de pesquisa

Av. dos Estados, 5001, Santa Terezinha, Santo André/SP, CEP 09210-580

Bloco L, 3ºAndar, Fone (11) 3356-7617

iniciacao@ufabc.edu.br

Projeto de Iniciação Científica submetido
para avaliação no Edital: 04/2022

Título do projeto: Avaliação dos efeitos da exposição alcóolica fetal no hipocampo de camundongos

Palavras-chave do projeto: Desenvolvimento, degeneração, morte celular, reflexos neurológicos

Área do conhecimento do projeto: Neurofisiologia, Neurociência

Sumário

1 Resumo	2
2 Introdução e Justificativa	3
3 Objetivos	7
4 Metodologia	7
4.1. Modelo Animal	7
4.2. Coleta de tecido	7
4.5. Acompanhamento do desenvolvimento	8
4.6. Teste comportamental	8
4.7. Análise estatística	9
5 Viabilidade	10
6 Cronograma de atividades	10
Referências	11

1 Resumo

O consumo de álcool durante a gravidez provoca consequências cognitivas e física, como o comprometimento da memória espacial ligado principalmente à disfunção do hipocampo. Nos Estados Unidos, estima-se que a cada 1000 nascidos vivos, nascem cerca de 0,2 à 1,5 crianças com a Síndrome Fetal Alcoólica. Já no Brasil, de acordo com a Associação Médica Brasileira, em algumas regiões esse número pode corresponder a 38 para cada nascidos vivos, no entanto, acredita-se que este número esteja subnotificado. A utilização de modelos animais permite investigar quais as consequências do álcool durante o desenvolvimento, podendo ser abordado em diferentes momentos da gravidez, primeiro, segundo ou terceiro trimestre, prejudicando processos específicos que ocorrem em cada uma das etapas do neurodesenvolvimento. Assim, utilizando o modelo em camundongo, nós iremos avaliar primariamente as consequências da ingestão de álcool que corresponderia ao primeiro e segundo trimestre de gestação em humanos, iremos quantificar o número de células em processo de morte celular no hipocampo, a morfologia, volume e peso hipocampal, além de realizar testes de desenvolvimento somático e reflexos neurológicos. Este

projeto irá contribuir para a padronização de um modelo possibilitando a criação de propostas terapêuticas que possam minimizar as sequelas causadas pelo consumo de álcool durante a gestação.

2 Introdução e Justificativa

O consumo de álcool durante a gravidez provoca consequências cognitivas e físicas, sendo atualmente, um dos mais intrigantes problemas de saúde materno-infantil. Além de causar de má formação congênita, a síndrome fetal alcoólica também representa uma séria questão de ordem socioeconômica e de educação. Esta condição clínica decorre do consumo de bebidas alcoólicas durante a gravidez, provocando severas alterações no desenvolvimento fetal. De acordo com o Centro de Controle de Doenças e Prevenção dos Estados Unidos, o número de bebês que nascem com este problema é de 0,2 à 1,5 para cada 1000, enquanto que, de acordo com a Associação Médica Brasileira, este número pode corresponder 38 bebês a cada 1000 em regiões de periferia [1][2].

Estudos a partir de modelos animais, mostram o comprometimento da memória espacial ligado principalmente à disfunção do hipocampo, a dificuldade de formação de memórias e a falta de assimilação em atividades que fomentam o medo (Kelly, Goodlett et al. 1988, Berman and Hannigan 2000, Allan, Chynoweth et al. 2003, Choi, Allan et al. 2005). Ainda, a adição de etanol na gestação provoca um processo de apoptose e um declínio da proliferação e células pelo Sistema Nervoso Central (SNC), com alterações em quantidade e em diminuição no tamanho das células, dos dendritos e das conexões sinápticas (Davies and Smith 1981, Abel, Jacobson et al. 1983, Ferrer, Galofre et al. 1988, Diaz Perez, Espinosa Villanueva et al. 1991). De forma macroscópica, pacientes com exposição fetal ao álcool apresentam uma deformação crânio facial aparente - sendo este o principal indicador para tomar a decisão de diagnóstico SFA (Síndrome Fetal Alcoólica). Essas consequências são reunidas dentro da nomenclatura FASD (*Fetal Alcohol Spectrum Disorder*) que significa Espectro de Transtorno Fetal Alcoólico (Hill, Hegemier et al. 1989, Robin and Zackai 1994).

Além de alterações no neurodesenvolvimento, é possível observar mudanças também na prole adulta. Dentre as estruturas mais alteradas, destaca-se o hipocampo, e dentre os processos modificados destaca-se o processo de neurogênese, recentemente salientado pela comunidade científica. Isto é, o consumo de álcool durante a gravidez tem repercussão até o desenvolvimento adulto, afetando principalmente o processo cognitivo de formação de memórias coordenado pela neurogênese que ocorre na região do giro denteado (DG), no hipocampo (Bruel-Jungerman, Rampon et al. 2007).

A maneira e intensidade que o etanol pode afetar o feto depende do *timing* de consumo e da dose administrada. Discutindo primeiramente o *timing* de consumo, é importante salientar os diferentes estágios de gestação e a diferença de gestação em humanos e em roedores. A gestação humana é separada em três trimestres e em cerca de 40 semanas, período em que ocorre todo o desenvolvimento principal do cérebro. Já a gestação dos roedores é separada em três semanas e dura em média de 21 a 22 dias, no caso dos ratos, e de 18 a 21 dias, no caso dos camundongos (Wigal and Amsel 1990, Tran, Cronise et al. 2000, Cronise, Marino et al. 2001). Além dessa diferença significativa de duração, também há a diferença no desenvolvimento cerebral que ocorre principalmente no pós-natal, ou seja, após o nascimento. O primeiro período da gravidez em humanos, em roedores, equivale aos dias gestacionais (GD) 1-10, o segundo aos GDs 11-21, e o terceiro equivale aos dias pós-natal (PNDs) 1-10. Essa correspondência deixa claro a importância do processo de desenvolvimento cerebral que ocorre nos roedores após o nascimento (Guerri, Marques et al. 1989). Outra opção de modelo animal que consegue simular o terceiro trimestre dentro do útero é a utilização de porquinhos-da-índia - porém a utilização desses animais não é favorável em todos os casos, pois tem um período gestacional maior e uma ninhada menor (Richardson, Byrnes et al. 2002, Byrnes, Richardson et al. 2004, Iqbal, Dringenberg et al. 2004, McAdam, Brien et al. 2008).

Desse modo, com o modelo animal de roedores é possível analisar as consequências do consumo de etanol em diferentes fases da gestação. Existem alguns períodos críticos de desenvolvimento durante a gestação, e o etanol atua e prejudica o feto de formas diferentes levando em consideração cada período

crítico. Em roedores, o primeiro período crítico ocorre no início da gestação, entre os dias gestacionais (GDs) 5 a 11, nesse período há o processo inicial de organogênese, formando o tubo neural e os primeiros precursores neurais. O consumo de álcool da mãe durante esse período provoca principalmente deformações crânio faciais e características físicas da SFA (Sulik, Johnston et al. 1981). O segundo período crítico ocorre entre os GDs 11-21, quando ocorre o processo de diferenciação celular da maioria das áreas do cérebro. Durante esse período, há a formação dos neurônios piramidais, a proliferação e migração de neurônios do hipocampo e do núcleo sensorial central. Portanto, o consumo de álcool durante esse segundo período afeta diretamente as estruturas supracitadas e também interfere no volume total do cérebro (Miller 1992, Guerri 1998). Já o terceiro e último período crítico ocorre entre os GD18 e PND9, e o consumo de álcool durante o período em questão afeta diretamente o volume cerebral, visto que a proliferação de células astrogliais, sinaptogênese, e arborização dendrítica são processos afetados. Esse período crítico final é o mais suscetível à consequências graves pois altera a diferenciação e o processo de neurogênese, um dos mais importantes, até a vida adulta (Vorhees and Fernandez 1986, Marcussen, Goodlett et al. 1994, Guerri 1998, Bruel-Jungerman, Rampon et al. 2007, Mandal, Park et al. 2015, Amiri, Davie et al. 2020).

Após discutir a relevância do *timing* de consumo, é importante destacar a quantidade de etanol consumido para entender os sintomas finais da SFA. Para isso, há uma padronização de medida chamada de *Blood Alcohol Content* (BCA), e isso significa a quantidade de álcool por unidade de sangue. Essa medida normalmente é tirada após quatro horas de exposição ao álcool (Serbus, Young et al. 1986). Outro ponto interessante relacionado ao *timing* é o prejuízo causado na região do giro denteado (DG). Alguns autores acreditam que a exposição ao álcool somente no período pré-natal não causa tantos efeitos nas células DG, mas a combinação de consumo durante o período pré- e pós-natal têm grande impacto nas células de DG (Wigal and Amsel 1990, Miller 1992, Livy, Parnell et al. 2003, Burke, Inyatkin et al. 2016, Varaschin, Allen et al. 2018).

Afinal, agora que discutimos essas diferenças, como alinhar e diminuir essas desconformidades entre os processos de gestação? Pensando

principalmente em como aplicar isso aos modelos de estudos com os roedores, o principal dilema a ser enfrentado é o terceiro trimestre da gestação visto que, nos camundongos, esse processo ocorre fora do útero, e é um dos mais importantes para o desenvolvimento cerebral. Existe a necessidade de alinhar a quantidade de álcool consumido, pois na gestação humana há a barreira da placenta e o líquido amniótico, causando uma diluição do nível de etanol consumido. Desse modo, é necessário ajustar a quantidade de álcool que vai ser induzido à ninhada de camundongos e para isso existem algumas técnicas de ingestão, como inserir etanol na dieta líquida, fazer uma intubação intragástrica, influir o consumo por inalação, ou até mesmo projetar uma criação artificial (Lieber and DeCarli 1982, Serbus, Stull et al. 1986, Kelly, Goodlett et al. 1988, Tran, Cronise et al. 2000, Cronise, Marino et al. 2001, Redila, Olson et al. 2006). Cada um desses processos apresenta pontos positivos e negativos, portanto a escolha do método deve levar em conta sua finalidade, levando em consideração as variáveis como estresse animal, simulação de *binge-drinking* e níveis de BCA.

Já é constatado alguns fatos sobre a influência do álcool no cérebro, como por exemplo a diminuição de células na região neural CA1 e hipocampo dorsal, porém não há a diminuição de densidade cerebral nas regiões CA3, DG, nos primeiros dias de gestação (Bonthius and West 1990). Já durante a metade dos dias gestacionais, há uma grande queda nas células DG e 3% de álcool é o necessário para provocar anomalias neuroanatômicas. Sendo assim, o ponto de análise principal diz respeito à neurogênese e em como a SFA afeta a área hipocampal. Sobre a neurogênese, é conhecido que a FASD atrapalha o processo de formação de circuitos normais nos neurônios corticais, portanto as consequências se tornam de longo prazo (Miller 1992, Varaschin, Allen et al. 2018, Reid, Lysenko-Martin et al. 2020, Xu, Li et al. 2020, Yu, Shi et al. 2020).

Tendo em vista os problemas que o consumo de álcool durante a gravidez pode trazer em questões cognitivas, o intuito principal dessa Iniciação Científica é padronizar e investigar como e quais são as consequências diretas da interferência que o etanol tem na morte celular, alterações na morfologia (volume, peso) hipocampal. Além disso, iremos avaliar o desenvolvimento somático e reflexos neurológicos destes animais..

3 Objetivos

O objetivo do presente projeto é avaliar se o consumo de álcool durante o período gestacional equivalente ao primeiro e segundo trimestre de gestação, causa morte celular no hipocampo por meio de marcadores como TUNEL e FluoroJade C, alteração no desenvolvimento em questão de tamanho e peso dos animais expostos ao álcool, e por meio de testes de crescimento somático, maturação de características físicas e desenvolvimento de reflexos neurológicos.

4 Metodologia

4.1. Modelo Animal

Neste projeto, serão utilizados camundongos C57BL6. Será feito o acompanhamento do ciclo da camundongo fêmea P90, a fim de detectar o ciclo estral, quando será colocado o macho para o acasalamento. No dia seguinte, o macho será retirado e será feito o acompanhamento semanal do peso do camundongo fêmea. A partir do primeiro dia de gestação, será fornecido ao animal água com etanol 25%, como descrito por Shawa e colaboradores (El Shawa, Abbott et al. 2013), até o vigésimo dia de gestação. Para o grupo controle, será colocado apenas água *ad libitum*. Os filhotes provenientes das ninhadas com e sem intervenção de álcool serão acompanhados diariamente, e coletados em períodos pré-definidos. Para estudo de morte celular, será coletado na idade P4. Para esse projeto, será utilizado tanto machos como fêmeas.

4.2. Coleta de tecido

Os animais serão profundamente anestesiados com uma solução de quetamina e xilazina (dose letal) e serão perfundidos transcardiacamente com solução tampão fosfato 0,01M, pH 7,4, a 4°C. Em seguida, serão perfundidos com solução de 4% de paraformaldeído (PFA) a 4°C. O encéfalo será dissecado e colocados em solução de PFA 4% *overnight*. Em seguida, a solução será trocada por solução de crioproteção, sacarose 30%, permanecendo por 2 dias. Os encéfalos serão emblocados em material crioprotetor (OCT) e cortados em espessura de 20 um no criostato em lâminas gelatinizadas.

4.3. FluoroJade-C

A técnica de ensaio de FluoroJade-C será realizada a fim de observar os neurônios em degeneração. De forma resumida, as lâminas com o tecido de hipocampo serão incubadas com uma solução de 0,06% de permanganato de potássio por 15 min em agitação suave e constante. Então, uma solução de 0,01% de FluoroJade (Histo-Chem Inc.; Jefferson, AR) será aplicada por 30 min seguida de posteriores lavagens, secagem e fechamento das lâminas.

4.4. Acompanhamento do desenvolvimento

O desenvolvimento de cada animal será avaliado diariamente pelas medidas do corpo de P1 à P21 utilizando um paquímetro. Será avaliado o eixo antero-posterior da cabeça (distância entre o focinho e a articulação cabeça-pescoço), eixo médio lateral da cabeça (distância entre os buracos auriculares) e o comprimento do corpo (distância entre o focinho e a base da calda). Além disso, será feita a medida do peso corpóreo.

Serão observadas as características de desenvolvimento físico como o desdobramento da orelha, a abertura do canal auditivo, a erupção dos incisivos superior e inferior e abertura dos olhos conforme descrito por Matsuda, 2021 (Matsuda, Tejada et al. 2021). O dia em que tais características são observadas pela primeira vez, determina características de maturação da idade.

4.5. Teste de desenvolvimento de reflexos neurológicos

Serão avaliados os reflexos neurológicos dos animais expostos ao álcool durante o desenvolvimento, a partir de P4 até P21, incluindo reflexo de correção de superfície, colocação das vibrissas, esquiva de queda, geotaxia negativa, resposta de susto acústico e endireitamento em queda livre. A presença de reflexo e consolidação é determinada quando observa-se por três dias consecutivos.

Para o reflexo de correção de superfície o filhote será colocado em posição supina em uma superfície lisa e o teste será considerado positivo quando o filhote retorna para o suporte nas quatro patas em um período máximo de 10 segundos.

Reflexo de pegada palmar - Será colocado um fino bastão embaixo das patas do animal, e o teste será positivo quando o animal agarrar o bastão quando acariciado.

Colocação das vibrissas - o filhote será ressuspenso pela cauda de uma forma em que as vibrissas serão levemente encostadas na beira de uma mesa. Será considerado positivo quando o animal, em um período máximo de 10s, colocar as patas dianteiras na mesa a fim de tentar andar.

Esquiva da queda - o filhote será posto com suas patas dianteiras na beira de uma superfície plana e alta para ele estimar queda. Será considerada resposta positiva quando o animal, em um período máximo de tempo de 10s, mover-se a 45° para evitar a queda.

Geotaxia negativa - O filhote será posto no centro de uma rampa de inclinação de 45° e de ponta cabeça. A resposta ao reflexo será considerada positiva quando ele se desvirar em um período máximo de 10s, e portanto será considerado hábil a rotacionar o corpo.

Resposta de susto acústico - O filhote será submetido a um som de estalar agudo, produzido pela percussão de duas estruturas de metal em uma distância de 10 cm do animal. A resposta será considerada positiva quando há uma diminuição simultânea com um movimento rápido e involuntário do corpo do animal, características de medo.

Endireitamento em queda livre - O filhote será mantido de ponta cabeça por quatro pernas com as costas voltadas para baixo a uma distância de 30 cm sobre uma cama de espuma sintética (30 × 12 cm) e então será solto e sua queda livre observada. A resposta será considerada positiva quando, durante a queda, o animal girou completamente o corpo apoiando-se nas quatro patas na espuma. O primeiro de uma série de três dias consecutivos em que a resposta estava presente será considerado o dia da consolidação dos reflexos.

4.6. Análise estatística

Todos os gráficos serão representados pela média +- erro padrão da média, com p-valor estimado de 0,05%. O 'n' amostral será calculado com base

na literatura. Para as análises histológicas, serão considerados os hipocampus ventrais e caudais, com ao menos 4 cortes por animal. Todos os testes estatísticos serão realizados pelo software GraphPrism, e determinados de acordo com a distribuição da amostra.

5 Viabilidade

Este projeto foi elaborado pensando em sua viabilidade de execução. Embora o grupo ainda não trabalhe oficialmente com o modelo de exposição materna ao álcool, a discente encontra apoio em uma pós-doutoranda e três pós-graduandos para o desenvolvimento do projeto. Ainda, todas as técnicas posteriores à exposição ao álcool já se encontram padronizadas no laboratório e com os reagentes já adquiridos. Reiteramos também que o protocolo de ética em uso de animais (CEUA - UFABC) já está em formulação para que os animais estejam disponíveis assim que o edital se iniciar. O laboratório contém infraestrutura e espaço disponíveis para o desenvolvimento do projeto, e pretende-se a realização de reuniões quinzenais para a discussão dos resultados e literatura levantada.

6 Cronograma de atividades

1. Etapa 1 - Padronização do estímulo para ocorrência da síndrome alcoólica fetal
 - a. Etapa 1.a.: aprovação do protocolo na CEUA - UFABC
 - b. Etapa 1.b.: padronização da ingestão de álcool na mãe
 - c. Etapa 1.c.: acompanhamento da gestação e do desenvolvimento dos filhotes
2. Etapa 2 - Realização de testes comportamentais
 - a. Etapa 2.a.: Acompanhamento do desenvolvimento dos animais, como aspectos macroscópicos e comportamentais
3. Etapa 3 - Coleta do tecido de hipocampo para observações celulares e morfológicas
 - a. Etapa 3.a.: realização de imunofluorescência
 - b. Etapa 3.b.: realização de ensaios de morte celular
4. Etapa 4 - Análise dos dados
 - a. Etapa 4.a.: análise quantitativa dos dados comportamentais e de desenvolvimento

- b. Etapa 4.b.: análise dos ensaios de imunofluorescência e morte celular
- c. Etapa 4.c.: discussão dos resultados com base na literatura
- 5. Etapa 5 - Apresentação dos dados
 - a. Etapa 5.a.: Redação e apresentação de relatórios
 - b. Etapa 5.b: Elaboração do pôster para apresentação no Simpósio de Iniciação Científica

Tabela 1 – Exemplo de cronograma de atividades previstas

Etap a	Mês											
	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
1.a.	X	X	X									
1.b.	X	X	X									
1.c.			X	X	X	X						
2.a.			X	X	X	X	X	X				
3.a.						X	X	X	X	X		
3.b..						X	X	X	X	X		
4.a.					X	X	X					
4.b.									X	X	X	
4.c.					X	X	X	X	X	X	X	X
5.a.					X	X					X	X
5.b.												X

Referências

Abel, E. L., S. Jacobson and B. T. Sherwin (1983). "In utero alcohol exposure: functional and structural brain damage." Neurobehav Toxicol Teratol **5**(3): 363-366.

Allan, A. M., J. Chynoweth, L. A. Tyler and K. K. Caldwell (2003). "A mouse model of prenatal ethanol exposure using a voluntary drinking paradigm." Alcohol Clin Exp Res **27**(12): 2009-2016.

Amiri, S., J. R. Davie and M. Rastegar (2020). "Chronic Ethanol Exposure Alters DNA Methylation in Neural Stem Cells: Role of Mouse Strain and Sex." Mol Neurobiol **57**(2): 650-667.

Berman, R. F. and J. H. Hannigan (2000). "Effects of prenatal alcohol exposure on the hippocampus: spatial behavior, electrophysiology, and neuroanatomy." Hippocampus **10**(1): 94-110.

Bonthius, D. J. and J. R. West (1990). "Alcohol-induced neuronal loss in developing rats: increased brain damage with binge exposure." Alcohol Clin Exp Res **14**(1): 107-118.

Bruel-Jungerman, E., C. Rampon and S. Laroche (2007). "Adult hippocampal neurogenesis, synaptic plasticity and memory: facts and hypotheses." Rev Neurosci **18**(2): 93-114.

Burke, M. W., A. Inyatin, M. Pito, F. R. Ervin and R. M. Palmour (2016). "Prenatal Alcohol Exposure Affects Progenitor Cell Numbers in Olfactory Bulbs and Dentate Gyrus of Vervet Monkeys." Brain Sci **6**(4).

Byrnes, M. L., D. P. Richardson, J. F. Brien, J. N. Reynolds and H. C. Dringenberg (2004). "Spatial acquisition in the Morris water maze and hippocampal long-term potentiation in the adult guinea pig following brain growth spurt--prenatal ethanol exposure." Neurotoxicol Teratol **26**(4): 543-551.

Choi, I. Y., A. M. Allan and L. A. Cunningham (2005). "Moderate fetal alcohol exposure impairs the neurogenic response to an enriched environment in adult mice." Alcohol Clin Exp Res **29**(11): 2053-2062.

Cronise, K., M. D. Marino, T. D. Tran and S. J. Kelly (2001). "Critical periods for the effects of alcohol exposure on learning in rats." Behav Neurosci **115**(1): 138-145.

Davies, D. L. and D. E. Smith (1981). "A Golgi study of mouse hippocampal CA1 pyramidal neurons following perinatal ethanol exposure." Neurosci Lett **26**(1): 49-54.

Diaz Perez, H., J. Espinosa Villanueva and J. Machado Salas (1991). "Behavioral and hippocampal morphological changes induced by ethanol administered to pregnant rats." Ann N Y Acad Sci **625**: 300-304.

El Shawa, H., C. W. Abbott, 3rd and K. J. Huffman (2013). "Prenatal ethanol exposure disrupts intraneocortical circuitry, cortical gene expression, and behavior in a mouse model of FASD." J Neurosci **33**(48): 18893-18905.

Ferrer, I., F. Galofre, D. Lopez-Tejero and M. Llobera (1988). "Morphological recovery of hippocampal pyramidal neurons in the adult rat exposed in utero to ethanol." Toxicology **48**(2): 191-197.

Guerri, C. (1998). "Neuroanatomical and neurophysiological mechanisms involved in central nervous system dysfunctions induced by prenatal alcohol exposure." Alcohol Clin Exp Res **22**(2): 304-312.

Guerri, C., A. Marques, M. Sancho-Tello and J. Renau-Piqueras (1989). "Effect of prenatal exposure to alcohol on membrane-bound enzymes during astrocyte development in vivo and in primary culture." Int J Dev Biol **33**(2): 239-244.

Hill, R. M., S. Hegemier and L. M. Tennyson (1989). "The fetal alcohol syndrome: a multihandicapped child." Neurotoxicology **10**(3): 585-595.

Iqbal, U., H. C. Dringenberg, J. F. Brien and J. N. Reynolds (2004). "Chronic prenatal ethanol exposure alters hippocampal GABA(A) receptors and impairs spatial learning in the guinea pig." Behav Brain Res **150**(1-2): 117-125.

Kelly, S. J., C. R. Goodlett, S. A. Hulsether and J. R. West (1988). "Impaired spatial navigation in adult female but not adult male rats exposed to alcohol during the brain growth spurt." Behav Brain Res **27**(3): 247-257.

Lieber, C. S. and L. M. DeCarli (1982). "The feeding of alcohol in liquid diets: two decades of applications and 1982 update." Alcohol Clin Exp Res **6**(4): 523-531.

Livy, D. J., S. E. Parnell and J. R. West (2003). "Blood ethanol concentration profiles: a comparison between rats and mice." Alcohol **29**(3): 165-171.

Mandal, C., J. H. Park, H. T. Lee, H. Seo, I. Y. Chung, I. G. Choi, K. H. Jung and Y. G. Chai (2015). "Reduction of Nfia gene expression and subsequent target genes by binge alcohol in the fetal brain." Neurosci Lett **598**: 73-78.

Marcussen, B. L., C. R. Goodlett, J. C. Mahoney and J. R. West (1994). "Developing rat Purkinje cells are more vulnerable to alcohol-induced depletion during differentiation than during neurogenesis." Alcohol **11**(2): 147-156.

Matsuda, V. D. V., M. B. Tejada, L. C. Motta-Teixeira, J. M. Ikebara, D. S. Cardoso, A. V. Machado-Nils, V. Y. Lee, I. Diccini, B. P. Arruda, P. P. Martins, N. M. M. Dias, R. P. Tessarotto, R. Raeisossadati, M. Bruno, L. F. Takase, A. H. Kihara, M. I. Nogueira, G. F. Xavier and S. H. Takada (2021). "Impact of neonatal anoxia and hypothermic treatment on development and memory of rats." Exp Neurol **340**: 113691.

McAdam, T. D., J. F. Brien, J. N. Reynolds and H. C. Dringenberg (2008). "Altered water-maze search behavior in adult guinea pigs following chronic prenatal ethanol exposure: lack of mitigation by postnatal fluoxetine treatment." Behav Brain Res **191**(2): 202-209.

Miller, R. J. (1992). "Ingested ethanol as a factor in double vision." Ann N Y Acad Sci **654**: 489-491.

Redila, V. A., A. K. Olson, S. E. Swann, G. Mohades, A. J. Webber, J. Weinberg and B. R. Christie (2006). "Hippocampal cell proliferation is reduced following prenatal ethanol exposure but can be rescued with voluntary exercise." Hippocampus **16**(3): 305-311.

Reid, H. M. O., M. R. Lysenko-Martin, T. M. Snowden, J. D. Thomas and B. R. Christie (2020). "A Systematic Review of the Effects of Perinatal Alcohol Exposure and Perinatal Marijuana Exposure on Adult Neurogenesis in the Dentate Gyrus." Alcohol Clin Exp Res **44**(6): 1164-1174.

Richardson, D. P., M. L. Byrnes, J. F. Brien, J. N. Reynolds and H. C. Dringenberg (2002). "Impaired acquisition in the water maze and hippocampal long-term potentiation after chronic prenatal ethanol exposure in the guinea-pig." Eur J Neurosci **16**(8): 1593-1598.

Robin, N. H. and E. H. Zackai (1994). "Unusual craniofacial dysmorphism due to prenatal alcohol and cocaine exposure." Teratology **50**(2): 160-164.

Serbus, D. C., R. E. Stull and K. E. Light (1986). "Neonatal ethanol exposure to rat pups: resultant alterations of cortical muscarinic and cerebellar H1-histaminergic receptor binding dynamics." Neurotoxicology **7**(2): 257-278.

Serbus, D. C., M. W. Young and K. E. Light (1986). "Blood ethanol concentrations following intragastric intubation of neonatal rat pups." Neurobehav Toxicol Teratol **8**(4): 403-406.

Sulik, K. K., M. C. Johnston and M. A. Webb (1981). "Fetal alcohol syndrome: embryogenesis in a mouse model." Science **214**(4523): 936-938.

Tran, T. D., K. Cronise, M. D. Marino, W. J. Jenkins and S. J. Kelly (2000). "Critical periods for the effects of alcohol exposure on brain weight, body weight, activity and investigation." Behav Brain Res **116**(1): 99-110.

Varaschin, R. K., N. A. Allen, M. J. Rosenberg, C. F. Valenzuela and D. D. Savage (2018). "Prenatal Alcohol Exposure Increases Histamine H3 Receptor-Mediated Inhibition of Glutamatergic Neurotransmission in Rat Dentate Gyrus." Alcohol Clin Exp Res **42**(2): 295-305.

Vorhees, C. V. and K. Fernandez (1986). "Effects of short-term prenatal alcohol exposure on maze, activity, and olfactory orientation performance in rats." Neurobehav Toxicol Teratol **8**(1): 23-28.

Wigal, T. and A. Amsel (1990). "Behavioral and neuroanatomical effects of prenatal, postnatal, or combined exposure to ethanol in weanling rats." Behav Neurosci **104**(1): 116-126.

Xu, W., H. Li, C. He, J. Frank and G. Chen (2020). "Early Ethanol Exposure Inhibits the Differentiation of Hippocampal Dentate Gyrus Granule Cells in a Mouse Model of Fetal Alcohol Spectrum Disorders." Alcohol Clin Exp Res **44**(5): 1112-1122.

Yu, Y., Z. Shi, D. Xu, Y. Li, J. Qin, Z. Zhang and H. Wang (2020). "Prenatal ethanol exposure increases susceptibility to depression- and anxiety-like behavior in adult female offspring and its underlying mechanism." Reprod Toxicol **96**: 36-46.