

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO – UFRJ
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO CLEMENTINO FRAGA FILHO -
HUCCF
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: ANATOMIA
PATOLÓGICA



INTERNEURÔNIOS INIBITÓRIOS DO NEOCÓRTEX E SUA RELAÇÃO COM A
EPILEPTOGÊNESE FRENTE À EXPOSIÇÃO PRÉ-NATAL AO ÁLCOOL

THAMYRES BASTOS DE AZEVEDO

Rio de Janeiro

2025

THAMYRES BASTOS DE AZEVEDO

**INTERNEURÔNIOS INIBITÓRIOS DO NEOCÓRTEX E SUA
RELAÇÃO COM A EPILEPTOGÊNESE FRENTE À
EXPOSIÇÃO PRÉ-NATAL AO ÁLCOOL**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em
Anatomia Patológica da Universidade Federal do Rio de
Janeiro como parte dos requisitos para obtenção do grau de
Mestre em Anatomia Patológica.

Orientador: Henrique Rocha Mendonça

Rio de Janeiro
202

FOLHA DE APROVAÇÃO
THAMYRES BASTOS DE AZEVEDO

INTERNEURÔNIOS INIBITÓRIOS DO NEOCÓRTEX E SUA RELAÇÃO
COM A EPILEPTOGÊNESE FRENTE À EXPOSIÇÃO PRÉ-NATAL AO
ÁLCOOL

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Anatomia Patológica, da
Universidade Federal do Rio de Janeiro para qualificação.
Orientador: Henrique Rocha Mendonça

Aprovada em: 01/08/2025

Banca Examinadora:

Dr. Henrique Rocha Mendonça (Orientador)

Dr. Pablo Trindade, UFRJ (Examinador)

Dr^a. Katia Calvi Lenzi de Almeida, UFRJ (Examinadora)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à Deus e aos meus pais, que até aqui conduziram minha vida e esteve comigo durante todo o percurso

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, em primeiro lugar, por ter estado diariamente comigo durante toda a minha caminhada: nas noites mal dormidas, nas lágrimas e em todos os momentos em que o cansaço, a dúvida e o medo me consumiam. Não há dúvidas de que Deus já havia traçado o meu caminho muito antes, quando eu ainda nem sonhava com a possibilidade de fazer iniciação científica no Laboratório de Neurodegeneração e Reparo.

Em segundo lugar, agradeço à minha família: aos meus pais e à minha irmã, que me ajudaram e me incentivaram quando eu já não tinha mais forças. Aos meus pais, que não pouparam esforços, tanto nos conselhos quanto no apoio financeiro para estarem ao meu lado. Ao meu pai, Alessandro, que me levava e buscava sempre que eu precisava ir à UFRJ, que me aconselhava, me dava amor... Sem dúvida, eu não teria conseguido nem 5% sem você, meu pai. À minha mãe, Kátia, que, com seu amor, me acolhia, orava por mim e sempre pedia a Deus por mim e pelo meu mestrado. À minha irmã, Thayse, que já foi minha “colega de quarto” por muitos anos, viveu e compartilhou tantas experiências comigo. À minha família: sem vocês, certamente eu não teria conseguido concluir essa etapa.

Em terceiro lugar, agradeço à minha segunda família —a família da pesquisa: Luiza e Henrique. Estiveram comigo desde 14 de outubro de 2021, meu primeiro dia como aluna de iniciação científica, e acompanharam diversas fases da minha vida e do meu amadurecimento. À Luiza, minha amiga, irmã e professora, guardo com carinho cada ensinamento seu. Obrigada por não desistir de mim. Ao Henrique, meu sincero agradecimento: nas horas difíceis, sei com quem posso contar.

Ao Laboratório de Neurodegeneração e Reparo, e às professoras Ana Martinez e Fernanda, agradeço por me receberem tão bem e por todos os aprendizados que levarei comigo. Ao Pedro e à Thais, que me ajudaram na fase final do mestrado, ambos com um coração generoso e muita atenção, meu muito obrigada por todo o apoio. À professora Bruna Ramalho, que me apresentou ao mundo da pesquisa e me mostrou que esse caminho pode ser o pontapé para algo ainda maior, expresso minha profunda gratidão.

Agradeço também aos meus avós, Anna Maria e Júlio César; aos meus tios Karinne e Ary; e aos meus primos amados. Vocês fizeram parte de muitas etapas

importantes da minha vida.

Por fim, há tanto a agradecer neste momento. A todos que estiveram comigo e vivenciaram cada etapa da minha formação: meu muito obrigada.

Confie no Senhor de todo o seu coração
e não se apoie
em seu próprio entendimento

RESUMO

A exposição pré-natal ao álcool (PAE) é considerada um fator de risco que pode levar a alterações no desenvolvimento do sistema nervoso central, como mudanças estruturais e funcionais, incluindo epileptogênese. Este estudo teve como objetivo investigar os efeitos da PAE sobre a excitabilidade cortical e os interneurônios inibitórios no neocórtex de camundongos, com foco nos subtipos Parvalbumina+, Somatostatina+ e Peptídeo vasoativo intestinal (VIP)+. Fêmeas grávidas da linhagem Suíço foram submetidas à administração oral de etanol (3,0 g/kg, 30% v/v) entre os dias 14 e 19 de gestação. No 16º dia pós-natal (DPN16), os filhotes foram avaliados quanto à suscetibilidade a convulsões febris e induzidas por pentilenotetrazol (PTZ), além da análise morfológica encefálica e imunofluorescência para identificação de interneurônios. Os resultados demonstraram que a PAE não causou alterações significativas na largura e comprimento do córtex cerebral. No entanto, observou-se aumento da duração da fase 6 da crise induzida por PTZ nos animais expostos ao etanol, bem como maior latência para a crise febril. A imunomarcagem evidenciou aumento da densidade de interneurônios Parvalbumina+ nas camadas supragranulares do córtex, sem alterações significativas nas populações de Somatostatina+ e VIP+. Esses achados indicam que a PAE mostra alterações na distribuição de interneurônios impactando a regulação da excitabilidade cortical e possivelmente contribuindo para a maior suscetibilidade à epileptogênese observada na síndrome do espectro alcoólico fetal.

Palavras-chave: exposição pré-natal ao álcool; interneurônios; epilepsia; córtex cerebral; neurodesenvolvimento.

ABSTRACT

Prenatal alcohol exposure (PAE) is considered a risk factor that can lead to alterations in the development of the central nervous system, such as structural and functional changes, including epileptogenesis. This study aimed to investigate the effects of PAE on cortical excitability and inhibitory interneurons in the neocortex of mice, focusing on the Parvalbumin+, Somatostatin+, and Vasoactive Intestinal Peptide (VIP)+ subtypes. Pregnant Swiss mice were subjected to oral administration of ethanol (3.0 g/kg, 30% v/v) from gestational day 14 to 19. On postnatal day 16 (PND16), the offspring were evaluated for susceptibility to febrile and pentylenetetrazol (PTZ)-induced seizures, as well as for brain morphology and immunofluorescence analysis to identify interneurons. The results showed that PAE did not cause significant changes in cortical thickness or length. However, an increased duration of stage 6 of the PTZ-induced seizure was observed in ethanol-exposed animals, as well as a longer latency to febrile seizures. Immunolabeling revealed an increased density of Parvalbumin+ interneurons in the supragranular layers of the cortex, with no significant changes in the Somatostatin+ and VIP+ populations. These findings suggest that PAE alters the distribution of interneurons, impacting the regulation of cortical excitability and possibly contributing to the increased susceptibility to epileptogenesis observed in fetal alcohol spectrum disorder.

Keywords: prenatal alcohol exposure; interneurons; epilepsy; cerebral cortex; neurodevelopment

LISTA DE ABREVIACÕES

AMPA - inglês " α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid"

ARBD- Distúrbio congênitos associados ao álcool

ARND- Distúrbios neurológicos relacionado ao álcool

Ca²⁺- Cálcio

CG-Eminência ganglionar caudal

Cl- : Cloreto

CP- Pré-Cortical

CR- Calretinina

CTC- Circuitos córtico-talâmicos

DPN16- 16º dia pós-natal

E/I- Excitação/ Inibição

EGC- Eminência Ganglionar Caudal

EGL- Eminência Ganglionar lateral

EGM- Eminência Ganglionar medial

FASD- Desordem do espectro alcoólico fetal

GABA- Gama-Aminobutírico

GAD65/67 - ácido glutâmico descarboxilase

GD19- Dia gestacional 19º

K+ : Potássio

LGE- Eminência ganglionar lateral

MGE- Eminência ganglionar medial

MZ- Zona Marginal

Na⁺ : Sódio

NK2.1/ TTF-1- Fator de transcrição da tireóide 1

NKCC 1:– Co-transportador de cloreto de sódio e potássio

NMDA: N-metil-D- Aspartato

NPY- Neuropeptídeo Y

PAE- Exposição Pré-Natal ao álcool

PFAS- Síndrome alcoólica fetal parcial

PP- Pré-placa

PTZ-Pentilenotetrazol

PV- Parvalbumina

SNC- Sistema nervoso central

SP- Subplaca

SST- Somatostatina

TRPV3- Canal catiônico de potencial receptor transitório, subfamília V, membro 3

VIP- Peptídeo Intestinal Vasoativo

ZI- Zona intermediária

ZSV- Zona Subventricular

ZV- Zona Ventricular

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Desenvolvimento do córtex cerebral.....	17
Figura 2: Migração Tangencial.....	18
Figura 3: Distribuição dos neurônios nas camadas do córtex cerebral.....	20
Figura 4: Neurônio corado com Golgi-cox.....	21
Figura 5: Representação esquemática da síntese, liberação e recaptação do ácido gama-aminobutírico (GABA), principal neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central.	26
Figura 6: Representação do encéfalo de camundongo.....	29
Figura 7: Imuno-histoquímica do córtex marcada com DAPI.	39
Figura 8: Figura 8: Desenho experimental	41
Figura 9: Análise macroscópica do córtex cerebral frente à PAE..	42
Figura 10: Análise da excitabilidade cerebral frente à PAE.....	43
Figura 11: Análise da população de neurônios Parvalbumina +.....	44
Figura 12: Análise da população de neurônios Somatostatina +.	45
Figura 13: Análise da população de neurônios Peptídeo vasoativo intestinal +.	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Especificação de anticorpo primário utilizado na imuno-histoquímica	
.....	41
Tabela 2- Especificação de anticorpo secundário utilizado na imuno-histoquímica	
.....	41

1. SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
1.1 Desenvolvimento cortical.....	18
2. DESENVOLVIMENTO DOS NEURÔNIOS EXCITATÓRIOS DO NEOCÓRTEX 22	
3. DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA NERVOSO INIBITÓRIO	23
4. TIPOS DOS NEURÔNIOS INIBITÓRIOS	26
4.1 Interneurônios que expressam somatostatina (SST)	28
4.2 Interneurônios que expressam parvalbumina (PV)	29
4.3 Interneurônios que expressam VIP	30
5 EXCITABILIDADE DO CÓRTEX	31
6 PAE E EPILEPTOGÊNESE	33
7. JUSTIFICATIVA	36
8. OBJETIVOS.....	37
9 MATERIAIS E MÉTODOS	38
9.1 Animais.....	38
9.2 Exposição ao etanol em camundongos grávidas	38
9.3 Verificação à predisposição a convulsões febris na infância.....	38
9.4 Verificação da predisposição a convulsão induzida por pentilenotetrazol	39
9.5 Análise macroscópica do comprimento e da largura encefálica.....	39
9.6 Marcação por imunofluorescência.....	40
10 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	42
11 RESULTADOS	44
11.1Análise macroscópica do córtex cerebral frente à PAE.....	44
11.2 Análise da excitabilidade cerebral frente à PAE	44
11.3 Análise da população de neurônios Parvalbumina +.....	46
11.4 Análise da população de neurônios Somatostatina +.....	47
11.5 Análise da população de neurônios VIP +.....	48
12 DISCUSSÃO.....	49
12.1 PAE e microcefalia	50
12.2 PAE e excitabilidade cerebral.....	52
12.4 PAE e neurônios inibitórios	54
12.5 Neurotransmissão inibitória e excitabilidade cerebral	56
13 CONCLUSÃO	59
14 REFERÊNCIAS:	60

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC) envolve uma série de eventos altamente organizados, desde a formação do tubo neural, células neuroepiteliais, processo de proliferação, diferenciação celular, migração, maturação e sinaptogênese que levam a formação de redes neuronais funcionais (Stiles et al., 2010; Bystron, Blakemore & Rakic, 2008). A neurogênese é regulada por interações entre sinais genéticos, epigenéticos e ambientais. Durante o desenvolvimento embrionário em períodos críticos da formação do sistema nervoso central, eventos como infecções ou ingestão de álcool podem levar a alterações na estrutura e função do sistema nervoso central (Rakic, 2007).

A exposição ao álcool provoca aumento da incidência de diferentes agravos à saúde da mulher, e a ingestão do álcool durante a gestação, pode impactar de forma severa o processo de neurodesenvolvimento, resultando em maior risco de mortalidade e embriotoxicidade e teratogenicidade fetal. Sabe-se que o etanol é uma droga amplamente utilizada em todo o mundo, e que parte alarmante das mulheres fazem o uso do álcool durante o período gestacional. Além disso, o etanol tem a capacidade de atravessar livremente a barreira hematoplacentária e se distribuir por todos os tecidos fetais (Guerri et al., 2009). Entretanto, o efeito da metabolização do álcool, no feto, gera um prejuízo a ambos, levando a alterações mais severas e permanentes (Riley, Infante & Warren, 2011). O etanol é um teratígeno potente em humanos, sendo o consumo de álcool durante a gestação considerado um problema de saúde pública. (Krulwich, 2005; Fabbri et al., 2007).

A exposição ao álcool no período gestacional está associada a desordem do espectro alcoólico fetal (do inglês, fetal alcohol spectrum disorder - FASD), que é uma condição que afeta crianças cujas mães consumiram álcool durante a gestação. Clinicamente a FASD pode ocasionar algumas alterações, como restrição de crescimento, dismorfologias faciais, distúrbios no SNC, distúrbios cognitivos e comportamentais. A exposição alcoólica pode acarretar em: 1) diferentes malformações no desenvolvimento cortical (MDC), a depender da exposição em distintos períodos críticos da corticogênese; 2) induzir um atraso na função neurológica; e 3) acarretar no desenvolvimento de epilepsia, através das alterações no desenvolvimento dos circuitos neurais, apresentando até 20 vezes a probabilidade

de desenvolver convulsões após o nascimento (Bell et al., 2010)

Diversos estudos de neuroimagem e neuropatologia demonstram que FASD está associada a malformações estruturais, incluindo redução do volume encefálico, hipoplasia do corpo caloso e displasias corticais, que são indicativas de falhas no processo de migração neuronal (Sowell et al., 2008; Lebel et al., 2011). Essas alterações são indicativas de falhas no processo de migração neuronal, mudança na proliferação de células progenitoras, apoptose, diferenciação celular, formação de sinapses (Guerri et al., 2009; Miller, 2016).

A migração dos neurônios ocorre por dois modos: radial e tangencial. A migração radial é típica dos neurônios glutamatérgicos excitatórios do córtex. Durante o processo de desenvolvimento do sistema nervoso central, os neurônios gerados nas zonas germinativas corticais, como a zona ventricular (ZV) e a zona subventricular (ZSV), migram em direção às suas devidas posições nas diferentes camadas corticais. Esse processo é importante para o correto posicionamento dos neurônios glutamatérgicos na organização do córtex cerebral e a formação dos circuitos neuronais (Marín, 2013; Silva, Peyre & Nguyen, 2019). Esses neurônios se deslocam perpendicularmente à superfície, guiados por prolongamentos da glia radial, até formarem a arquitetura em camadas do neocórtex (Rakic, 2007; Silva et al., 2019). Já a migração tangencial, é realizada por interneurônios inibitórios gabaérgicos, que originam em regiões subpaliais, como a eminência ganglionar medial (EGM), eminência ganglionar lateral (EGL) e eminência ganglionar caudal (EGC), e migram paralelamente às superfícies do encéfalo até atingir o córtex e outras regiões (Marín, 2013; Lim et al., 2018).

Em suma, os efeitos do álcool no desenvolvimento SNC perturbam a organogênese cerebral, de forma dependente do período gestacional e a duração do consumo de álcool durante a gestação (Sadrian *et al*, 2013). Conhecer os efeitos da PAE durante os diferentes períodos da gestação é de grande interesse científico e clínico para se compreender, evitar e tratar os diferentes problemas neurológicos a serem enfrentados em nossa comunidade, onde esta exposição ainda é altamente prevalente.

1.1 Desenvolvimento cortical

Desenvolvimento cortical é um processo altamente complexo, dinâmico e orquestrado, tendo grande importância para a formação do sistema nervoso central, levando a funções cognitivas, motoras e comportamentais, entre outras. Sua ação envolve processos que incluem a proliferação de células progenitoras na ZV, migração neuronal, tanto radial quanto tangencial, diferenciação celular, sinaptogênese e formação de camadas corticais (Silbereis et al., 2016; Marín, 2016).

O SNC é formado a partir da ectoderme neural, que sofre invaginações e assim forma o tubo neural. Este processo ocorre durante a quarta semana de desenvolvimento, sendo o ponto de partida para a formação das diferentes regiões do encéfalo e da medula espinhal (Rakic, 2007). Na região do telencéfalo (Figura 1), as células progenitoras estão organizadas inicialmente na ZV, adjacente ao canal neural. A partir da ZV surge também a ZSV, que serve como nicho para a proliferação de células troncos. (Lui, Hansen & Kriegstein, 2011).

Os neurônios excitatórios, são secretores de glutamato e são originados na ZV. Após sua geração, eles migram radialmente e sua movimentação ocorre das camadas mais internas para as camadas mais superficiais do neocórtex (Rakic, 2007). Este processo segue um padrão “de dentro para fora”, no qual os neurônios gerados primeiro ocupam as camadas mais profundas (camadas V e VI) e os neurônios gerados posteriormente formam as camadas mais externas (II e III) (Silva et al., 2019).

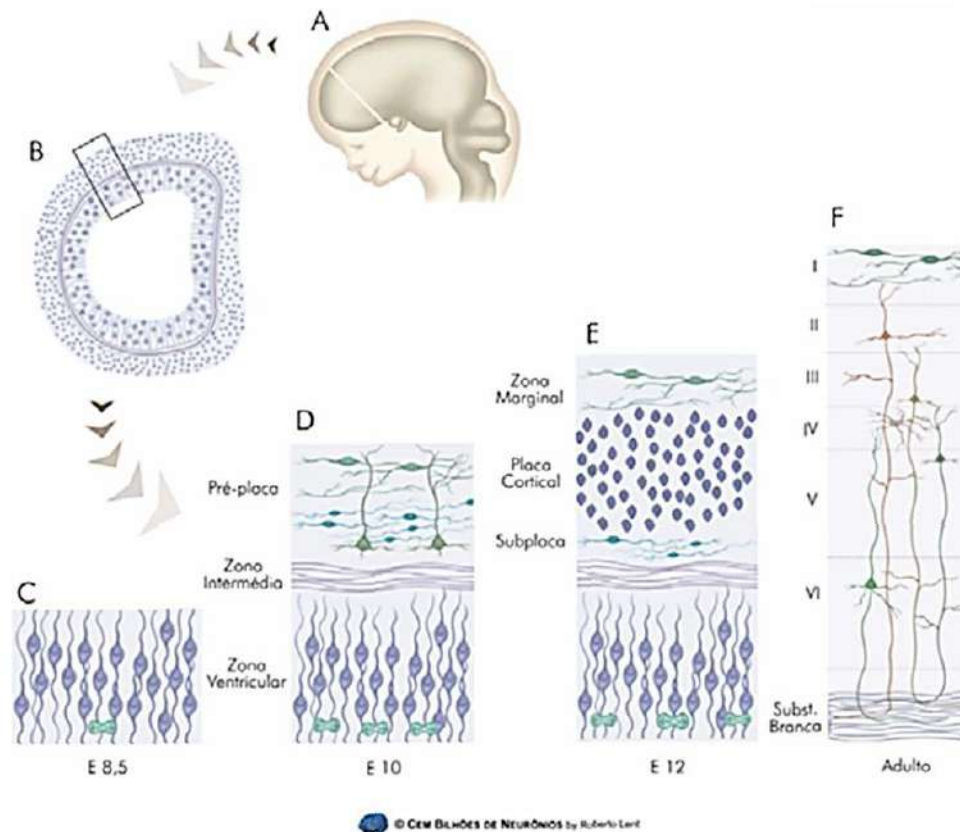


Figura 1: Desenvolvimento do córtex cerebral. inicia-se na zona ventricular (VZ), composta por progenitores neuronais e gliais. Os primeiros neurônios gerados migram e formam a pré-placa (PP). Seus axônios, juntamente com axônios provenientes do tálamo, estabelecem sinapses na zona intermediária (IZ). Neurônios gerados subsequentemente, que irão compor as camadas corticais II a VI, formam a placa cortical (CP), a qual divide a pré-placa em duas estruturas: a zona marginal (MZ), que futuramente dará origem à camada I do córtex, e a subplaca (SP), uma estrutura transitória essencial para a organização inicial dos circuitos neurais (Fonte: Cem bilhões de neurônios- conceitos fundamentais de neurociências).

A migração adequada é essencial para a formação da laminação cortical, sendo assim, alterações que ocorram durante esse processo, podem gerar diferentes alterações a nível celular, bem como, estrutural. E desequilíbrios nesta formação geram desordens, como o quadro de lissencefalia, que é caracterizada pela ausência de giros e sulcos, e formação das camadas de fora para dentro, por exemplo (Guerri et al., 2009).

Já a migração tangencial (Figura 2) tem sua importância no posicionamento dos interneurônios inibitórios GABAérgicos (Marín, 2013). Estes interneurônios não são produzidos na mesma região dos neurônios excitatórios, mas sim na região conhecida como eminência ganglionar (medial, lateral e caudal). Sua migração ocorre lateralmente, paralelos à superfície cortical, até atingirem o neocórtex (Lim et al., 2018).

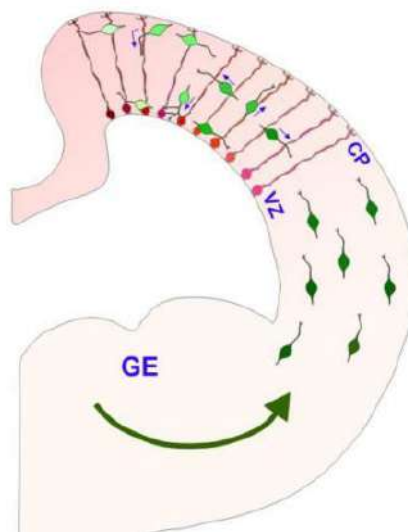


Figura 2: Migração Tangencial. As células neuroepiteliais originadas nas eminências ganglionares (GE), migram tangencialmente a pia-máter. Ao atingirem a placa cortical (CP), adentram a mesma de forma que exibem mudanças na direção da migração após o contato com as células da glia radial (células em vermelho), até alcançarem seu destino final (Fonte: Yokata et al., 2007).

Além disso, os neurônios se organizam nas seis camadas corticais do neocórtex (Figura 3), cada uma desempenhando funções específicas, que associadas levam ao correto funcionamento cortical (Bystron, Blakemore & Rakic, 2008).

6 camadas corticais:

- I. Camada molecular: É a mais superficial, sendo composta majoritariamente por axônios, dendritos apicais dos neurônios piramidais das camadas inferiores e interneurônios locais (Luhmann et al., 2018).
- II. Camada molecular externa composta por neurônios granulares e interneurônios, sendo responsáveis por projetar dendritos apicais para lâmina molecular e axônios se estendendo para camadas mais profundas (Luhmann et al., 2018).
- III. Camada piramidal externa: abriga neurônios piramidais de tamanho médio, cujo axônios se projetam, via corpo caloso, para outras regiões do córtex (Molnár et al., 2019; DeFelipe et al., 2002)
- IV. Camada granular interna: Constituída por neurônios granulares ou estrelados, é uma região especialmente desenvolvida em área sensorial primária, como o córtex somatossensorial e córtex visual, onde recebe a maior parte das aferências talâmicas. Esta camada é bem densa e pode ser subdividida em porções internas ou externas na maioria das áreas. (Rakic, 2009; DeFelipe et

al., 2002).

- V. Camada piramidal interna: Contém neurônios piramidais, de tamanhos médios e grandes. Esses neurônios possuem axônios longos que se projetam para estruturas subcorticais, como o tronco encefálico, medula espinhal e núcleos da base, sendo a via de saída de respostas motoras funções autonômicas (Molnár et al., 2019; Luhmann et al., 2018).
- VI. Camada multiforme: Composta por uma diversidade de tipos neuronais, incluindo neurônios fusiformes e piramidais. Essa camada desempenha um papel fundamental na modulação de informações talâmicas e regula os circuitos locais (Molnár et al., 2019).

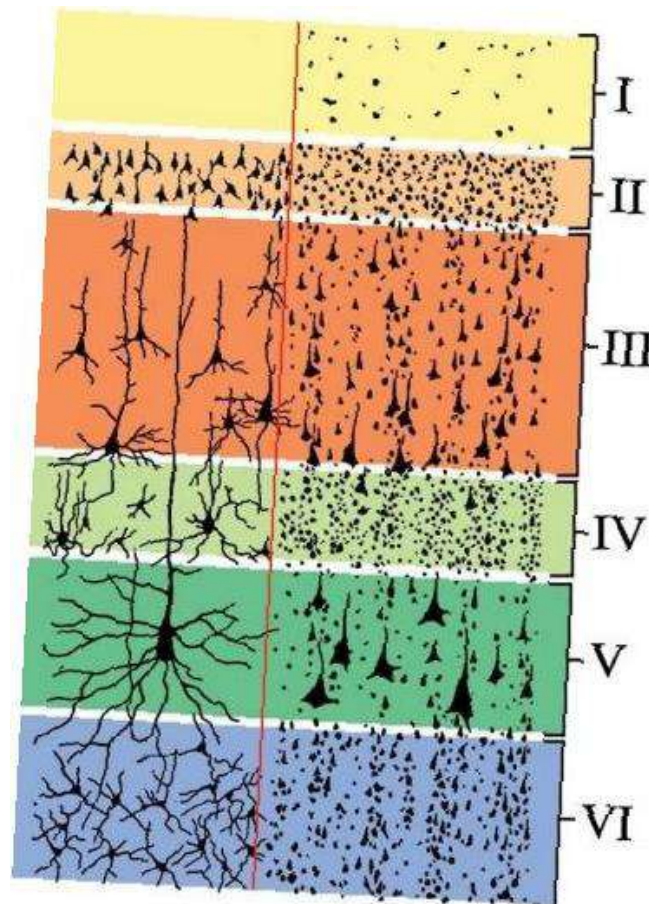


Figura 3: Distribuição dos neurônios nas camadas do córtex cerebral. Ilustração esquemática das seis camadas horizontais características do córtex cerebral. O lado esquerdo demonstra perfis de células individuais, como seria visto através da coloração de Golgi. O lado direito demonstra populações de perfis de corpos celulares como seriam vistos em uma coloração de Nissl. I = camada molecular; II = camada granular externa; III = camada piramidal externa; IV = camada granular interna; V = camada piramidal interna; e VI = camada multiforme. (Fonte: Modificado de Ranson, SW e Clark SL 1959 Anatomy of the Nervous System, 10ª ed. Filadélfia, WB Saunders Co.)

Com isso, o desenvolvimento cortical é um processo dinâmico, dependente de eventos altamente coordenados, como neurogênese, migração neuronal, radial e tangencial, formação laminar e plasticidade sináptica. A interação desses processos é fundamental para a construção de um encéfalo funcional, capaz de sustentar as complexas funções cognitivas e comportamentais humanas.

Portanto, a exposição pré-natal a teratógenos, como o álcool, são capazes de provocar alterações significativas no desenvolvimento, impactando diretamente a arquitetura cortical e os circuitos neuronais. As evidências científicas apontam para a necessidade de reforçar ações de prevenção, orientação e conscientização sobre os riscos do consumo de etanol durante a gestação.

2. DESENVOLVIMENTO DOS NEURÔNIOS EXCITATÓRIOS DO NEOCÓRTEX

O desenvolvimento dos neurônios excitatórios desempenha um papel importante na ativação de sinais elétricos e na regulação das funções cognitivas, motoras e sensoriais. Este sistema envolve processos altamente especializados, como proliferação de células progenitoras, diferenciação, migração neuronal, estabelecimento de conexões sinápticas e maturação funcional.

Neurônios glutamatérgicos (Figura 4) são componentes essenciais no sistema excitatório, e utilizam o glutamato como o principal neurotransmissor. Além disso, eles atuam promovendo a despolarização das membranas pós-sinápticas, permitindo a propagação do sinal elétrico no SNC, uma vez que a liberação de neurotransmissores ocorre em resposta à despolarização. Atua através de receptores metabotrópicos ou ionotrópicos, sendo os subtipos AMPA e Canal ativados apenas por glutamato, NMDA sendo um canal iônico dependente de despolarização e ligantes, entre eles o glutamato. (Huganir & Nicoll, 2013).

Durante o desenvolvimento, há um período de aumento da atividade sináptica, formando novas conexões de forma excessiva. Posteriormente, ocorre um processo de “poda sináptica”, no qual as sinapses menos utilizadas são eliminadas, enquanto as conexões mais ativas são estabilizadas e fortalecidas (Lebel & Beaulieu, 2011).

O processo de maturação do sistema excitatório não se encerra após a formação das sinapses. Durante os primeiros anos de vida, e se estendendo até a adolescência, o sistema passa por intensos processos de plasticidade sináptica e a capacidade de fortalecer ou enfraquecer conexões com base na experiência é crucial

para o funcionamento do SNC, como nos processos de aprendizagem e memória.

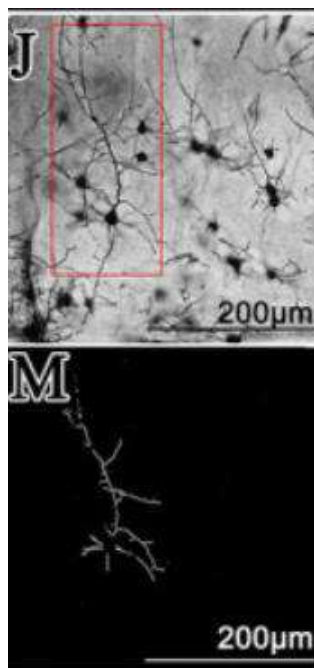


Figura 4: Neurônio corado com Golgi-cox. (J) Imagem representativa de neurônio piramidal da camada V no córtex visual de camundongo (M) Reconstrução da arborização dendrítica do neurônio em J . (Fonte: Adaptada de Heringer et al., 2022)

3. DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA NERVOSO INIBITÓRIO

Os neurônios inibitórios exercem papéis importantes na manutenção da balança de equilíbrio entre excitação e inibição. (Marín, 2012; Sohal & Rubenstein, 2019). Os interneurônios GABAérgicos são componentes predominantes no sistema inibitório e tem a utilização do ácido gama-aminobutíco (GABA) como neurotransmissor que atua na modulação da atividade neuronal, mantendo os neurônios no potencial de repouso ou hiperpolarização, e assim controlando a plasticidade sináptica e refinamento da circuitaria dos neuronais durante o desenvolvimento (Figura 5).

Os neurônios inibitórios são originados da base da eminência ganglionar do telencéfalo, estruturas transitórias do desenvolvimento embrionário, que incluem a MGE, LGE e a eminência caudal CGE, cada uma dessas estruturas originando subtipos específicos de interneurônios. A MGE, gera interneurônios expressando paravalbumina (Do inglês parvalbumin- PV) e somatostatina (Do inglês somatostatin- SST), que são fundamentais para a inibição rápida e o controle da excitabilidade

cortical. Já o CGE é responsável por gerar interneurônios que expressam peptídeo intestinal vasoativo (Do inglês vasoactive intestinal peptide- VIP) e calretinina (Do inglês calretinin- CR), associados a função moduladora e à regulação da atividade excitatória no encéfalo, incluindo o córtex e o hipocampo (Marín, 2012; Lim et al., 2018; Wonders & Anderson, 2006).

Diferente dos neurônios excitatórios, em que sua migração acontece de modo radialmente desde a ZV até as camadas corticais, os interneurônios inibitórios realizam uma migração predominantemente tangencial, se deslocando das eminências ganglionares, sendo orientado por uma série de sinais moleculares que atuam como guias atrativos e repulsivos, garantindo que os interneurônios cheguem corretamente ao destino. Para isso, moléculas como semaforinas, neuregulina, efrinas, e quimiocinas como CXCL12 e seus receptores CXCR4 desempenham papéis fundamentais no direcionamento dessa migração (Marín, 2012; Lim et al., 2018).

Além disso, sabe-se que os vasos sanguíneos possuem um importante papel no SNC, sendo necessário para regulação homeostática cerebral em desenvolvimento, bem como para a neurogênese e migração celular (Parnavelas et al., 2018). Diferentes estudos, demonstraram que a migração tangencial dos interneurônios está intimamente associada as células endoteliais (Vasudevan et al., 2013; Shi et al., 2016) Dados recentes evidenciam que a migração de neurônios GABAérgicos é regulada por neurônios excitatórios, além disso, relatou-se que o NMDA endotelial contribui para a migração de interneurônios associados aos vasos (Marín et al., 2017), uma vez que a exposição de pré-natal a moléculas antagonistas de NMDA como o álcool, resultam em autofagia de células endoteliais, levando a apoptose em grande escala de interneurônios GABA em rota de migração tangencial (Berki et al., 2015).

Após completarem a migração tangencial, esses neurônios realizam uma migração radial local para se posicionarem nas camadas apropriadas do córtex, onde passam a expressar marcadores moleculares específicos que definirão suas características funcionais e estruturais. Essa diferenciação dos interneurônios GABAérgicos é altamente dependente da expressão coordenada de genes que codificam fatores de transcrição como Nkx2.1, que está diretamente relacionada à especificação de identidade celular, Lhx6 que é fundamental para a migração, diferenciação e especificação dos interneurônios GABAérgicos originados na MGE;

Dlx1/2 que é importante para o desenvolvimento dos interneurônios GABAérgicos e outros tipos neuronais inibitórios; e por último, o Arx que é altamente expresso em progenitores neurais do telencéfalo ventral, especialmente nas eminências ganglionares (MGE, LGE e CGE), e desempenha papel essencial na migração tangencial e na diferenciação dos interneurônios GABAérgicos. Com isso, esses interneurônios regulam tanto a identidade celular quanto os destinos migratórios e sinápticos dos neurônios (Lodato & Arlotta, 2015; Wonders & Anderson, 2006; Marín, 2012).

Durante o desenvolvimento pós-natal, os interneurônios continuam realizando o processo de maturação morfológica e funcional, como o crescimento e a ramificação dos dendritos. Este processo de maturação inibitória, está intimamente relacionada às chamadas janelas críticas da plasticidade, e neste período o encéfalo é receptivo a estímulos externos e modula a organização funcional dos circuitos neuronais (Takesian & Hensch, 2013).

Mudança em qualquer etapa do desenvolvimento dos interneurônios GABérgicos, seja na diferenciação celular, na migração ou na formação das sinapses, podem resultar em desequilíbrios no balanço entre excitação-inibição (E/I), que é um mecanismo central na fisiopatologia de diversos transtornos neurais. (Sohal & Rubenstein, 2019; Marín, 2016).

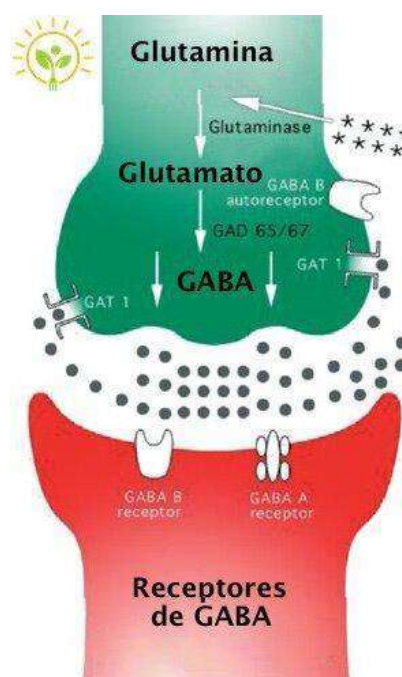


Figura 5: Representação esquemática da síntese, liberação e recaptação do ácido gama-aminobutírico (GABA), principal neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central. A partir da glutamina, ocorre a conversão em glutamato, que, por meio da ação das enzimas GAD65/67 (ácido glutâmico descarboxilase), é convertido em GABA. Uma vez liberado na fenda sináptica, o GABA atua nos receptores pós-sinápticos GABAA_AA (ionotrópicos) e GABAB_BB (metabotrópicos), promovendo efeitos inibitórios. Posteriormente, o neurotransmissor é recaptado pelos transportadores GAT para a terminação pré-sináptica, contribuindo para o controle da neurotransmissão e manutenção da homeostase sináptica (Fonte: Adaptada de Andreia Torres, 2020)

4. TIPOS DOS NEURÔNIOS INIBITÓRIOS

Os interneurônios GABAérgicos, que são componentes importantes no funcionamento do encéfalo, sendo importantes na regulação da excitabilidade neuronal e no equilíbrio entre a circuitaria do sistema excitatório e inibitório. Apesar de representar apenas cerca de 20% a 30% dos neurônios corticais, esses interneurônios possuem uma vasta heterogeneidade morfológica, molecular e funcional, que permite o controle da atividade sináptica e a modulação dos ritmos neuronais (Marín, 2012; Lim et al., 2018).

Os neurônios inibitórios apresentam marcadores moleculares específicos, em que cada um atua de modo individual nos disparos elétricos e na morfologia dos seus axônios e dendritos. Três grandes subtipos principais são amplamente reconhecidos no córtex encefálico, os interneurônios que expressam a PV, os que expressam a somatostatina SST e os que expressam VIP (Tremblay, Lee & Rudy, 2016).

Os interneurônios que expressam a PV+ são caracterizadas por uma resposta de disparo rápido próximo ao corpo celular da célula-alvo, e nos segmentos proximais dos dendritos dos neurônios piramidais. Este tipo de interneurônio tem papel central no controle da circuitaria do córtex cerebral (Hu, Gan & Jonas, 2014). Já os interneurônios que expressam a SST+, possuem baixo limiar de ativação e atuam predominantemente na inibição dos dendritos distais dos neurônios excitatórios, modulando a interação sináptica das informações que chegam ao córtex, desta forma (Urban-Ciecko & Barth, 2016). Por sua vez, os interneurônios que expressam VIP+, apresentam uma função inibitória indireta, conectando a outros interneurônios e gerando um processo de “desinibição” dos neurônios piramidais. Desta forma, os interneurônios VIP são particularmente importantes no processo de regulação da excitabilidade (Piacetini et al., 2021)

Além dos três grupos citados acima, existem outros subtipos de interneurônios identificados pela expressão de marcadores como a calretinina (CR), neuropeptídeo

Y (NPY), reelin e outros que contribuem para uma diversidade funcional ainda maior. Esta diversidade dos neurônios inibitórios é resultado de fatores de transcrição como NKx2.1, Lhx⁶ e Dlx1/2, além de serem moldados pela atividade elétrica e pela a experiência sensorial pós-natal (Lodato & Arlotta, 2015; Marín, 2016).

A ação do GABA ocorre por meio de dois tipos de receptores, os ionotrópicos, que são canais iônicos mediados pela ação de inibição rápida, e os metabotrópicos, que são acoplados à proteína G, promovendo inibição prolongada e moduladora da excitabilidade neuronal (Olsen & Sieghart, 2008). Durante o neurodesenvolvimento, a ação do GABA é inicialmente despolarizante, devido à alta concentração intracelular de cloro nos neurônios em desenvolvimento, e tem uma interação com a ação do co-transportador NKCC1. Conforme, ocorre a maturação, há uma interação do co-transportador NKCC2, em que há liberação externa de íons cloro de células, tornando a ação do GABA predominante hiperpolarizante. (Ben-Ari et al., 2007; Cellot & Cherubini, 2014; Marín, 2012).

Alteração nos receptores GABAérgicos, como disfunções, mutações nas subunidades, alterações do gradiente de cloreto, podem ocasionar na falha da inibição sináptica, contribuindo para um quadro de hiperexcitabilidade cortical, bem como, provocar crises convulsivas (Treiman, 2001; Schulz et al., 2012). O Pentilenotetrazol (PTZ) é amplamente utilizado em pesquisas para induzir convulsões em modelos animais. Seu mecanismo de ação envolve o bloqueio não competitivo dos receptores GABAA, inibindo a função inibitória e favorecendo a despolarização neuronal. A administração de PTZ em roedores pode desencadear crises convulsivas generalizadas, cuja intensidade e latência variam conforme a fase do desenvolvimento e a dose utilizada (Szyndler et al., 2018). O modelo com PTZ é amplamente valorizado na literatura por sua reprodutibilidade, baixo custo e viabilidade para estudos comportamentais e neurofisiológicos (Schulz et al., 2012). Além disso, conforme Heringer et al. (2022), a pesquisa voltada à investigação do sistema nervoso central fez uso do pentilenotetrazol (PTZ) como ferramenta para a avaliação comportamental.

Para quantificar a severidade dessas crises, utiliza-se a escala de Racine, que é desenvolvida para avaliar características motoras em modelos animais. Entretanto, Lüttjohann, Fabene e van Luijtelaa (2009) propuseram uma escala de Racine modificada, que compõem parâmetros comportamentais, tornando uma análise mais sensível e precisa a gerar crises convulsivas. Características, como tremores e

movimentos estereotipados, que muitas vezes precedem as crises motoras generalizadas. (Lüttjohann et al., 2009).

Escala de Racine adaptada, proposta para avaliar a mudanças das crises convulsivas induzidas pelo PTZ, são oito fases crescentes de severidade, permitindo a caracterização detalhada das manifestações comportamentais associadas à atividade epilética. Fase 1, os animais apresentam uma parada comportamental súbita/ freezing, após 5 segundo, se esse animal se mantém nesta condição, ele é caracterizado nesta fase (Heringer et al. 2022); fase 2, há espasmos orofaciais, como mastigação involuntária e movimento no bigode; fase 3, que é caracterizada por movimentos bruscos do pescoço ou arrancos cefálicos repetitivos; a fase 4 o animal é levado a convulsão clônica bilateral, em que o animal se mantém em posição sentado, a fase 5, é a fase de crise clônicas unilaterais, evidenciando maior envolvimento motor; a fase 6, é a convulsão tônica com preservação da postura corporal; a fase 7, é a fase de convulsão tônica com perda postural, indicando desorganização motora intensa; e a fase 8 é a convulsão tônico-clônica generalizada, caracterizada por perda completa do tônus e atividade motora descontrolada (Lüttjohann et al., 2009).

4.1 Interneurônios que expressam somatostatina (SST)

Os interneurônios positivos para SST representam um dos principais subtipos de neurônios inibitórios no córtex cerebral e em outras regiões do sistema nervoso central, esses neurônios GABAérgicos são fundamentais na regulação da excitabilidade neuronal, principalmente por meio da inibição dendrítica dos neurônios excitatórios, desempenhando um papel essencial na modulação da integração sináptica e no controle dos circuitos neuronais (Urban-Ciecko; Barth, 2016).

Morfológicamente, os interneurônios SST são caracterizados por corpos celulares localizados nas camadas profundas do córtex (principalmente nas camadas V e VI) e por axônios que se projetam verticalmente em direção às camadas superficiais, especialmente à camada I. Nessa região, eles formam sinapses inibitórias nos dendritos distais dos neurônios piramidais. Essa organização permite que os interneurônios que expressam a SST regulam a excitabilidade dendrítica (Wang et al., 2004; Tremblay; Lee; Rudy, 2016).

Além disso, os interneurônios que expressam a SST são cruciais para o controle da plasticidade sináptica, participando da filtragem de informações e da modulação dos sinais excitatórios. Apresentam papel principal na regulação dos dendritos distais e modulação da excitabilidade e do ganho sináptico dos neurônios piramidais (Urban-Ciecko; Barth, 2016; Karnani et al., 2016). A SST tem efeito neuromodulador, muitas vezes atuando como co-transmissor junto com o GABA, exercendo uma modulação mais lenta e prolongada da atividade sináptica (Harris; Shepherd, 2015).

Sua origem primária ocorre na MGE que é uma estrutura pertencente ao telencéfalo ventral embrionário. A especificação desse subtipo celular é controlada pela expressão de fatores de transcrição como NKx2.1, que tem o papel de direcionar a identidade dos progenitores da MGE, e Lhx6, fundamental para a migração, diferenciação e sobrevivência desses interneurônios (Marín, 2012; Lodato; Arlotta, 2015). Após sua geração, esses neurônios migram tangencialmente até o córtex dorsal, onde completam sua maturação com uma fase radial, posicionando-se nas camadas corticais apropriadas.

4.2 Interneurônios que expressam parvalbumina (PV)

Um dos principais subtipos dos neurônios inibitórios, a parvalbumina, é encontrada de forma abundante no córtex cerebral, hipocampo e em outras regiões associadas à cognição, percepção e regulação de comportamentos. Esses neurônios são caracterizados por uma eletrofisiologia com alta frequência de disparo e rápida cinética sináptica, e desempenham um papel essencial no controle da sincronização neuronal e na manutenção do equilíbrio entre excitação e inibição (Sohal et al., 2009; Hu; Ganjoo; Somogyi, 2014).

Morfológicamente, os interneurônios que expressam a PV fazem sinapses próximo ao corpo celular e nos segmentos proximais dos dendritos de neurônios piramidais. Deste modo, esses neurônios exercem um controle extremamente preciso sobre a geração de potenciais de ação, influenciando diretamente o disparo dos neurônios excitatórios e coordenando a atividade de populações neuronais inteiras (Hu; Ganjoo; Somogyi, 2014; Tremblay; Lee; Rudy, 2016).

Funcionalmente, esses interneurônios estão associados a funções cognitivas superiores, como atenção, memória de trabalho, processamento sensorial e

percepção consciente. Devido sua capacidade de disparo rápido e alta precisão temporal, os interneurônios PV+ atuam como “relógios locais”, sincronizando grupos de neurônios piramidais e permitindo a formação de redes neuronais coerentes (Sohal et al., 2009).

E no ponto de vista molecular, a parvalbumina é uma proteína com capacidade de ligar ao cálcio, desempenhando um papel crucial na regulação da excitabilidade e na recuperação dos níveis basais de cálcio intracelular após eventos de disparo. Esta característica de manter um disparo de alta frequência de maneira constante, com rápida recuperação entre os potenciais de ação, sem entrar em fadiga sináptica é algo que estes interneurônios podem proporcionar (Hu et al., 2014).

Os interneurônios da PV também são originados na base da MGE. A especificação deste subtipo é fortemente dependente dos fatores de transcrição NK2.1 e, posteriormente, Lhx6, que regulam tanto a migração tangencial para o córtex como a diferenciação final desses neurônios. Após a migração, esses interneurônios se posicionam predominantemente nas camadas II a VI do córtex, onde formam redes locais altamente organizadas. (Marín, 2012; Lodato; Arlotta, 2015).

Outro dado importante é que esses interneurônios são altamente sensíveis a fatores ambientais, como estresse, inflamação, hipóxia ou exposição a substâncias neurotóxicas, incluindo o álcool (Marín, 2016).

Portanto, os interneurônios que expressam a parvalbumina desempenham um papel central na organização e na estabilidade funcional dos circuitos corticais. Sua função de inibição rápida e precisa é indispensável para o correto processamento de informações, regulação da excitabilidade cortical e sincronização rítmica das redes neurais, sendo elemento-chave, tanto na saúde quanto na manifestação de diversos distúrbios neurológicos.

4.3 Interneurônios que expressam VIP

São constituídos por um subgrupo importante de neurônios inibitórios no córtex cerebral e em outras regiões do sistema nervoso central. Diferente dos interneurônios que expressam PV e SST, que realizam inibição direta sobre neurônios piramidais, os neurônios VIP, são conhecidos por realizarem uma função de “inibição da inibição”, ou seja, atua inibindo outros interneurônios, especialmente aqueles que expressam somatostatina (Piacentini et al., 2021; Trem-blav et al., 2016).

Estes interneurônios exercem um papel crucial na regulação dinâmica do equilíbrio E/I no córtex. A ativação dos neurônios leva à desinibição dos neurônios piramidais, facilitando assim o aumento da excitabilidade cortical (Kawaguchi et al., 1996; Donato et al., 2013).

Apresentando uma grande diversidade de formas e padrões de ramificação dendrítica, os interneurônios VIP estão localizados predominantemente nas camadas superficiais do córtex (camada I a III), embora possam ser encontradas também em camadas mais profundas, dependendo da área cortical. Eles exibem um padrão de disparo de baixa frequência e apresentam uma cinética mais lenta comparada aos interneurônios PV+ (Rudy et al., 2011; Trem-Blay et al., 2016).

Do ponto de vista molecular, o VIP é expresso também por outros interneurônios positivos para outros marcadores, como a calretinina (CR), e é modulado por diversos neurotransmissores, como acetilcolina e serotonina (Piacentini et al., 2021).

Já o processo de desenvolvimento desses interneurônios, sua origem acontece pela CGE, nesta fase, esses interneurônios se originam de forma mais tardiamente e apresentam uma migração tangencial para o córtex (Marín, 2012; Lodato; Arlotta, 2015).

Em suma, os interneurônios VIP desempenham um papel na regulação flexível da excitabilidade cortical, e ajustando a dinâmica dos circuitos neuronais para atender às demandas comportamentais e cognitivas. Sua função é complementar à dos interneurônios PV+ e SST+, sendo essenciais para a homeostase funcional do córtex, plasticidade e adaptação do sistema nervoso.

5 EXCITABILIDADE DO CÓRTEX

Com a capacidade de gerar e propagar potencial de ação em resposta a estímulos sinápticos, a excitabilidade cortical, atua gerando e propagando potenciais de ação em resposta a estímulos. Esta interação não é estática, mas sim dinâmica, sendo regulada por mecanismos moleculares, propriedades eletrofisiológicas dos neurônios e a influência de sistemas neuromoduladores (Tremblay et al., 2016; Sohal e Rubenstein, 2019).

No nível celular, a ação da excitabilidade é resultado da presença e do funcionamento de canais iônicos dependentes de voltagem distribuídos na membrana

plasmática dos neurônios. A ativação coordenada de canais de sódio (Na^+), potássio (K^+), cálcio (Ca^{2+}) e o Cloreto (Cl^-) permite a geração dos potenciais de ação e a modulação dos potenciais pós-sinápticos, fundamentais para a transmissão de informações neuronais (Katzner et al., 2011).

Os neurônios piramidais, principais células excitatórias do córtex, são moldadas pela organização dendrítica, que funciona como uma unidade comportamental capaz de realizar interações sinápticas não lineares. A presença de canais dependentes de sódio e cálcio nos dendritos permite que a geração de potenciais dendríticos locais, modulem a probabilidade de geração de potenciais de ação no axônio, e este mecanismo é essencial para o processamento e transmissão de informações no SNC (Larkum, 2013).

Com um processo delicado e dinâmico equilibrado entre os sinais excitatórios e inibitórios, a excitabilidade cortical mediada pelo neurotransmissor glutamato, precisa ser controlada por sinais inibitórios, predominantemente mediados pelo GABA. Esse balanço de E/I é importante, pois sua ação permite a homeostase e flexibilidade no processamento de informações (Sohal e Rubenstein, 2019). Quando este balanço enfrenta um quadro de desequilíbrio, seja por excesso de excitação ou deficiência de inibição, diversas manifestações como epilepsia, esquizofrenia e transtorno do espectro autista podem ser desenvolvidos (Marín, 2016).

Os interneurônios gabaérgicos atuam no processo de regulação da excitabilidade cortical. Estes neurônios formam uma classe altamente heterogênea, e é subdividida em neurônios positivos PV, somatostatina SST e peptídeo intestinal vasoativo VIP. Os interneurônios PV apresentam uma atuação de inibição de alta frequência, perto da zona gatilho de disparo de potenciais de ação, controlando com precisão o tempo dos disparos dos neurônios piramidais, essencial para a sincronização de oscilações encefálicas (Tremblay et al., 2016). Por outro lado, os interneurônios VIP atuam promovendo desinibição dos neurônios piramidais, um mecanismo fundamental para a flexibilização do processamento cortical, e os interneurônios SST atuam nos dendritos dos neurônios piramidais, regulando a entrada sináptica dendrito-específica, promovendo um ajuste fino no controle de quais aferentes promovem o disparo dos neurônios piramidais em diferentes situações (Lovett-Barron et al., 2012 e Piacentini et al., 2021).

A excitabilidade cortical é ainda modulada por sistemas neurodulatorios que utilizam neurotransmissores como acetilcolina, dopamina, serotonina e noradrenalina, entre outros. Por exemplo, a dopamina, particularmente no córtex pré-frontal, modula a excitabilidade de acordo com demandas cognitivas e facilitando funções executivas (Piacentini et al., 2021).

Além disso, fatores ambientais e epigenéticos influenciam na excitabilidade cortical. A PAE, por exemplo, pode comprometer o desenvolvimento dos circuitos excitatórios e inibitórios, levando a um desequilíbrio funcional que pode se manifestar como déficits cognitivos e comportamentais (Johnson et al., 2018).

Mudanças na regulação da excitabilidade cortical podem provocar um quadro de epilepsia, pois o desequilíbrio da balança E/I resulta em estados de hiperexcitabilidade que manifestam como descargas neuronais síncronas e paroxísticas, que corresponde a despolarização prolongadas por falta de controle inibitório, que geram mais potenciais de ação em sequência do que o esperado. No autismo e na esquizofrenia, alterações na função dos interneurônios, especialmente PV+ e SST+, estão associadas a disfunção na sincronização cortical e nos padrões oscilatórios, impactando o processamento sensorial, a cognição social e o comportamento (Sohal e Rubenstein, 2019; Marín, 2016)

6 PAE E EPILEPTOGÊNESE

A síndrome fetal alcoólica (do inglês: fetal alcohol syndrome - FAS) é o quadro mais alarmante da FASD, sendo a forma mais reconhecida clinicamente, caracterizada pela restrição de crescimento (baixo peso ao nascer, nutrição inadequada para sua idade), dismorfologias faciais (fissura palpebral pequena, lábio superior fino) e transtorno no SNC (microcefalia, malformações encefálicas, dificuldade motora) evidenciados por distúrbios motores, cognitivos e comportamentais. Além da FAS, a FASD apresenta outros grupos dentro dos efeitos adversos devido à PAE que estão sendo cada vez mais bem definidas, com uma prevalência alarmante de 1% de todos os nascidos vivos (Thackray H, Tiffet C, 2001).

Neste espectro inclui-se distúrbios congênitos associados ao álcool (ARBD do inglês: Alcohol-related birth defects) podendo ocasionar malformações cardíacas e alteração na fenda labial ou palato; Distúrbios neurológicos relacionados ao álcool (ARND do inglês: Alcohol related neurological disorders) que se evidencia em

distúrbios cognitivos (incapacidade de leitura, dificuldade de memória e de linguagem); Síndrome alcoólica fetal parcial (do inglês: Partial fetal alcohol syndrome - PFAS) caracterizada por ausência de estigmas faciais completos da FAS, e não apresenta restrição de crescimento (Thackray H, Tifft C, 2001).

A exposição pré-natal ao álcool no desenvolvimento cortical, interfere diretamente na proliferação dos progenitores neuronais, especialmente aqueles localizados na zona ventricular e subventricular. A exposição ao álcool induz apoptose, modula a ação de neurônios excitatórios glutamatérgicos e interneurônios inibitórios gabaérgicos, comprometendo o equilíbrio fundamental entre excitação e inibição do encéfalo (Gueorri et al., 2009; Lebel et al., 2011).

E em função dessa ação do álcool, no córtex acontece uma desorganização celular que resulta em alterações anatômicas visíveis, como espessamento cortical irregular, displasias, heterotopias neuronais e redução do volume encefálico, especialmente em regiões como o córtex, do hipocampo e o corpo caloso. Essas alterações estruturais impactam diretamente a funcionalidade deste encéfalo, prejudicando a formação de redes neuronais eficientes que são importantes para o processo sensorial, controle motor e cognição (Donald et al., 2015; Lebel et al., 2011).

Além disso, o álcool afeta diretamente os sistemas de neurotransmissores. A redução da funcionalidade dos receptores NMDA e AMPA, combinada à alteração nos receptores GABA A, compromete profundamente a estabilidade dos circuitos neuronais. E também o etanol interfere na expressão e funcionamento de canais iônicos de sódio, potássio e cálcio, alterando a geração e propagação dos potenciais de ação (Guerri et al., 2009).

E esta ação resulta na predisposição ao desenvolvimento de epilepsia em indivíduos expostos ao álcool durante a gestação. Estudos em modelos animais, mostraram que a exposição pré-natal ao álcool reduz significativamente o limiar convulsivo, aumentando a frequência de descargas epileptiformes espontâneas e favorecendo a ocorrência de crises generalizadas. Na prática clínica, há uma maior incidência de distúrbios de epilepsias em crianças diagnosticadas com FASD, além de déficits cognitivos, problemas comportamentais e dificuldades de aprendizagem, alterações nos circuitos corticais e na dinâmica da excitabilidade cerebral (Donald et al., 2015; Godin-Agé et al., 2021).

Dentre a gama de eventos adversos oriundos da FASD, a epilepsia é uma característica comum, uma vez que bebês que foram expostos no útero ao álcool, são até 20 vezes mais propensos a desenvolver convulsões e epilepsia após o nascimento (Bell et al., 2020; Cho SJ et al., 2020)

Além disso, evidenciou-se através de um estudo, que a PAE quando induzida no período correspondente ao segundo trimestre da gestação em ratos, está associada com o aumento de convulsões tônico-clônica generalizada, mediada por alterações nos receptores NMDA (Cho et al., 2020).

A epilepsia é uma desordem que apresenta uma variedade de manifestações patológicas caracterizadas pelo fenômeno de excitabilidade neuronal elevada, ocasionando descargas elétricas excessivas e sincrônicas evidenciadas através de crises eletrográficas recorrentes. Essas crises podem se manifestar com alteração da consciência e/ou eventos motores, sensitivos e sensoriais, bem como através de convulsões ou não (Landi et al., 2019; Costa et al., 2020). As convulsões são caracterizadas pela ocorrência temporária de atividade síncrona anormal no cérebro ou de uma atividade neuronal excessiva que desencadeia um comportamento motor característico (Fisher et al., 2014). Um estudo analisando a incidência de epilepsia e convulsões em pacientes acometidos por FASD, demonstrou uma prevalência de 17,7% nos pacientes. A prevalência para ocorrência de convulsões e epilepsia foi maior quando o consumo de álcool ocorreu no primeiro e segundo trimestre, ou ao longo de todos os trimestres, mas não no terceiro trimestre (Bell et al., 2010). De forma semelhante, diferentes estudos avaliaram um maior surgimento de convulsões e epilepsia em indivíduos que foram classificados com FAS, demonstrando uma incidência de até 21% para epilepsia ou transtorno convulsivo (O'Malley e Barr, 1998).

7. JUSTIFICATIVA

O desenvolvimento do córtex cerebral é um processo que envolve eventos sequenciais como proliferação, migração, diferenciação celular, formação de sinapses e manutenção da circuitaria neuronal. A desordem destes eventos, pode advir do desequilíbrio entre os sistemas excitatórios e inibitórios, sendo eles essenciais para a manutenção de funções cognitivas até sensoriais e comportamentais (Molnár et al., 2019)

Mudanças nesse equilíbrio podem resultar em alterações na maturação cortical, sendo a exposição pré-natal ao álcool um dos fatores ambientais que provocam esse desequilíbrio. A exposição pré-natal ao álcool, que é considerada um alarmante problema de saúde pública, uma vez que essa exposição apresenta a capacidade de afetar não somente a gestante, mas também ao feto, e tem fácil acesso independente da classe social, e envolve um grande risco relacionado ao desenvolvimento e a mortalidade. (Krulwich, 2005; Fabbri et al., 2007).

Dentre diversas alterações que são ocasionadas pela ingestão do álcool durante o período de desenvolvimento gestacional, a FASD é evidenciado por uma característica marcante, a epilepsia. Esta exposição pré-natal ao álcool durante o desenvolvimento do SNC, pode levar um desequilíbrio da razão E/I resultando em diferentes alterações neurológicas, e consequentemente a epilepsia, que é evidenciada em 17,7% dos pacientes acometidos pela FASD (BeIL et al., 2010; Roth FC, Draguhn A. 2012; Magloire V, et al., 2018). Desta forma, é importante compreender esses mecanismos pelos quais a exposição pré-natal ao álcool interfere no desenvolvimento cortical, especialmente no que se refere ao equilíbrio E/I. Estudos já têm demonstrado que estas alterações dos Interneurônios GABAérgicos, especialmente aqueles expressando a PV, SST e VIP estão associados a este desequilíbrio da balança E/I (Ben-Ari, 2002; Marín, 2012; Luhmann et al., 2018).

Sendo assim, o estudo do desenvolvimento de neurônios inibitórios e sua circuitaria após PAE será capaz de revelar mecanismos-alvo para intervenções terapêuticas para prevenir e tratar os muitos pacientes com FASD que desenvolvem epilepsia.

8. OBJETIVOS

8. .1 OBJETIVO GERAL

Correlacionar o desenvolvimento de neurônios inibitórios com as crises convulsivas na infância de camundongos submetidos a PAE.

8. 2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar o efeito da PAE na predisposição a convulsões induzidas por hipertermia e pelo Pentilenotetrazol no DPN16.
2. Avaliar o efeito da PAE na quantidade e distribuição de diferentes tipos de interneurônios inibitórios no neocórtex de camundongos

9 MATERIAIS E MÉTODOS

9.1 Animais

Camundongos da linhagem Suíço, em diferentes estágios do desenvolvimento, foram mantidos no biotério do Laboratório de Neurodegeneração e Reparo, do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (Rio de Janeiro), sob condições ambientais rigorosamente controladas, incluindo ciclo claro/escuro, temperatura constante e ventilação adequada, durante todo o período experimental. Todos os procedimentos haviam sido previamente aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (protocolo nº 018/20) e foram conduzidos em estrita conformidade com as normas estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e pelos princípios internacionais de ética em pesquisa com animais.

9.2 Exposição ao etanol em camundongos grávidas

Fêmeas grávidas da linhagem Suíço, no 14º dia de gestação (GD14), receberam, por via oral, uma dose diária de etanol na concentração de 3,0 g/kg a 30% (v/v) ou água (grupo controle/veículo), por meio de gavagem, até o 19º dia de gestação (GD19). A dosagem e concentração de etanol foram definidas com base em protocolos previamente validados na literatura (Siqueira et al., 2021). Protocolo caracterizado pela exposição pré-natal crônica ao etanol, aplicada de modo repetido dentro de um intervalo de 6 dias consecutivos, esse período é um período crítico e prolongado do segundo trimestre da gestação em roedores, equivalente à fase cortical no desenvolvimento humano (Guerriero et al., 2018; Miller, 2016)

9.3 Verificação à predisposição a convulsões febris na infância

No 16º dia pós-natal (DPN16), os animais foram submetidos à indução de hipertermia, mediante exposição a ar seco aquecido a 47–48 °C, gerado por um secador de cabelo, com monitoramento constante da temperatura ambiente por meio de um termômetro posicionado no interior de uma caixa acrílica. A exposição foi mantida até a ocorrência de uma crise convulsiva tônico-clônica generalizada. Foi registrado o tempo de latência até seu início.

9.4 Verificação da predisposição a convulsão induzida por pentilenotetrazol

No 16º dia pós-natal (DPN16), os animais receberam uma injeção intraperitoneal de pentilenotetrazol (PTZ) em dose convulsiva de 80 mg/kg, previamente dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO; C₂H₆OS) e diluído com 200 µL de água. Após a administração do fármaco, os animais foram filmados por um período de 10 minutos (0–10 minutos) e, em seguida, foram avaliados quanto à ocorrência e duração de cada fase comportamental, de acordo com a Escala de Racine adaptada (Va Qnerum et al., 2019; dos Santo Heringer et al., 2022).

A Escala de Racine adaptada compreendia oito estágios progressivos de severidade convulsiva, descritos da seguinte forma: (1) parada comportamental; (2) espasmos orofaciais; (3) arrancos de pescoço; (4) convulsões clônicas bilaterais com o animal em posição sentada; (5) convulsões clônicas unilaterais; (6) convulsão tônica com manutenção postural; (7) convulsão tônica com perda postural; e (8) convulsão tônico-clônica generalizada.

9.5 Análise macroscópica do comprimento e da largura encefálica

Uma das avaliações realizadas neste trabalho, foi a análise macroscópica do comprimento e da largura encefálica. Para isso, utilizou-se o programa ImageJ, no qual foi traçada uma linha dividindo os dois hemisférios cerebrais, considerando os planos sagital, medial, proximal e posterior. Essa análise se justifica pelo fato de que já foi relatado na literatura que uma das malformações associadas à exposição encefálica é a microcefalia (Oliveira & Bertolla, 2016). Diante disso, tornou-se necessário verificar se esse padrão morfológico também se repete neste modelo experimental. Importante frisar que, assim que terminamos a análise no primeiro animal, um padrão da linha foi estabelecido. Essa mesma linha foi repetida para todos os animais, de modo que todos apresentam distâncias similares de comprimento e largura (Figura 6).

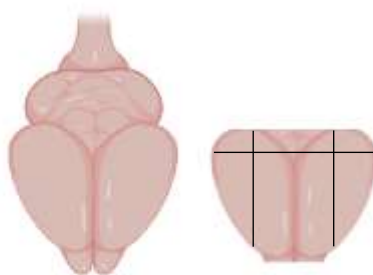


Figura 6: Representação do encéfalo de camundongo. Representação do encéfalo com linhas de referência traçadas nos eixos lateral e vertical em cada animal. Imagem representativa da análise macroscópica (Autoria própria).

9.6 Marcação por imunofluorescência

Imediatamente após a convulsão febril ou PTZ, os animais foram anestesiados por meio de injeção intraperitoneal de cetamina (100 mg/kg) associada à xilazina (15 mg/kg). Na sequência, foi realizada perfusão intracardíaca com solução de paraformaldeído a 4%. Posteriormente, os encéfalos foram submetidos à crioproteção em soluções de sacarose com concentrações crescentes até 30%, sendo então embebidos em OCT e congelados. Cortes histológicos coronais foram obtidos em criostato, a 40 micrômetros, coletados em eppendorfs contendo PBS + azida 1% e armazenados a 4° até o momento da imunorreação.

O protocolo de imunomarcção iniciou-se com duas lavagens em PBS (pH 7,4) por 5 minutos. Em seguida, realizamos a recuperação antigênica dos tecidos com tampão citrato (pH 6,4) a 90° por 30 minutos, posteriormente duas lavagens em PBS (pH 7,4) por 5 minutos, seguido pelo bloqueio de sítios inespecíficos utilizando PBS contendo Triton X-100 (0,3%) e 2,5% de soro normal de cabra. Em seguida, as amostras foram incubadas, por 24 horas, com os anticorpos primários (Tabela 1) diluídos na solução de bloqueio. Para cada reação, foi empregado um anticorpo primário específico para um subtipo de neurônio inibitório. Após nova lavagem em PBS, foi realizada a incubação com os anticorpos secundários conjugados Alexa Fluor 594 ou 488, específicos para a espécie na qual o anticorpo primário foi produzido. Na etapa final, as lâminas passaram por lavagens em PBS e foram

incubadas com DAPI para marcação nuclear. Por fim, as lâminas foram montadas com Fluoromount G (17984-25 – Electron microscopy sciences), cobertas com lamínulas e armazenadas em freezer até a realização da análise em microscopia.

A aquisição das imagens foi realizada em microscópio de fluorescência confocal acoplado a câmera fotográfica. Para a quantificação dos diferentes subtipos de interneurônios, foi realizada contagem manual, bem como análise da fração de área marcada, em duas fotomicrografias do córtex somestésico primário obtidas com aumento de 10x, contando-se separadamente as camadas supra- ou infragranulares. A separação morfológica das camadas supra- das infragranulares foi realizada traçando-se uma linha no meio da camada IV, conforme ilustrado na Figura 7.

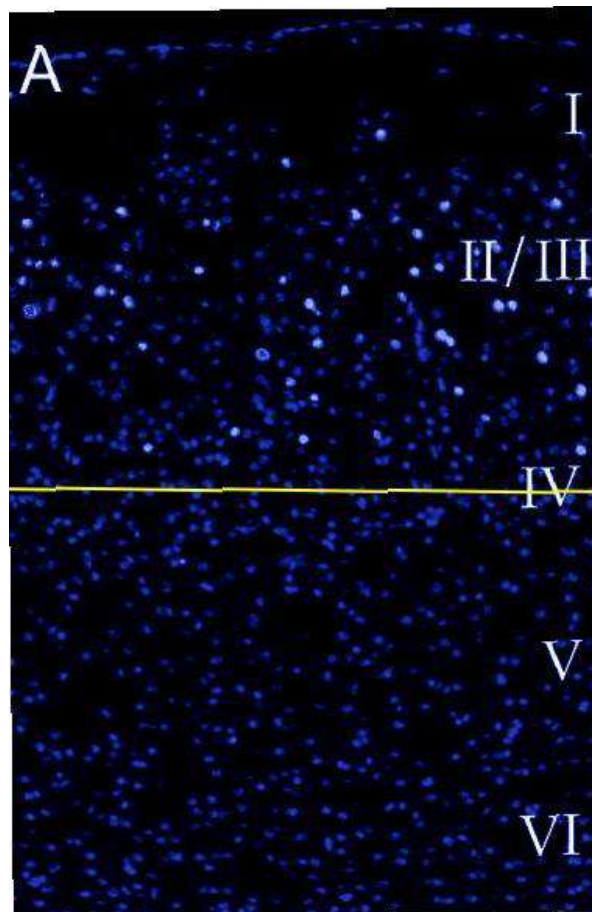


Figura 7: Imuno-histoquímica do córtex marcada com DAPI. Imagem representativa das camadas do córtex somatossensorial primário separadas pelas linhas tracejadas brancas. A linha contínua amarela representa o limite para quantificação do número de interneurônios nas camadas supra- e infragranulares do córtex de camundongos. (Adaptada de Gilmore e Herrup, 2001).

Tabela 1- Especificação de anticorpo primário utilizado na imuno-histoquímica

Anticorpo Primário	Identificação da estrutura marcada	Produzido	Diluição
Parvalbumina (P3088)	Interneurônios PV	Coelho	1:500
Somatostatina (SC-55565)	Interneurônios SST	Rato	1:100
Peptídeo vasoativo intestinal (SC-25347)	Interneurônios VIP	Coelho	1:500

Tabela 2- Especificação de anticorpo secundário utilizado na imuno-histoquímica.

Anticorpo Secundário	Produzido
546 goat rabbit	Cabra
488 goat ant rat	Cabra
546 goat anti-rabbit	Cabra

10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada utilizando o software GraphPad Prism 8.0. A normalidade dos dados foi verificada por meio do teste de Shapiro-Wilk. Para os dados que apresentaram distribuição normal, foi aplicado o teste t de Student. Caso contrário, foi empregado o teste não paramétrico de Mann-Whitney. A análise de ocorrência de cada fase da escala de Racine adaptada após crise induzida por PTZ

foi analisada através do teste qui-quadrado. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando o valor de p foi inferior a 0,05 ($p < 0,05$).

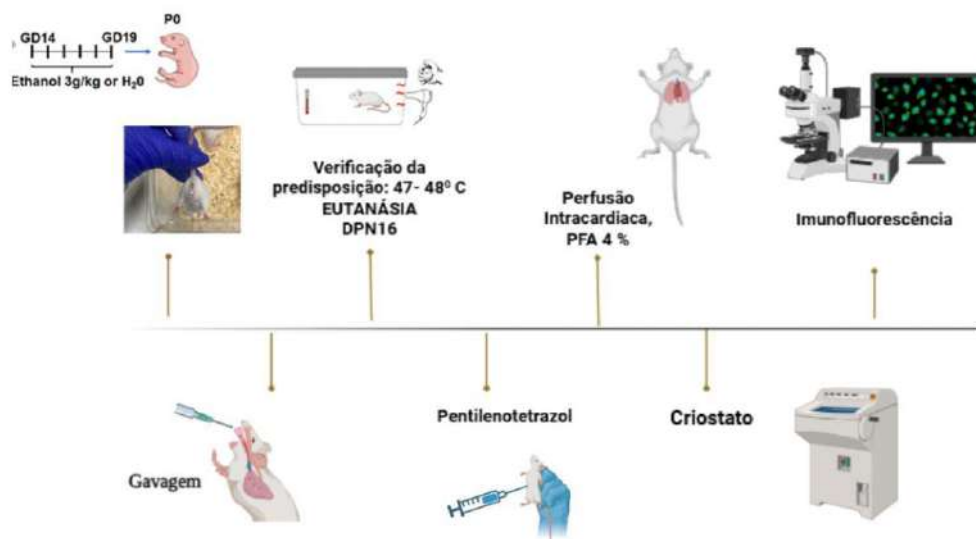


Figura 8: Desenho experimental. Desenho experimental da metodologia aplicada neste estudo, com a descrição detalhada dos procedimentos realizados.

11 RESULTADOS

11.1 Análise macroscópica do córtex cerebral frente à PAE

Nossos resultados mostram uma imagem macroscópica representativa do encéfalo de um animal do grupo veículo (Figura 9A) e do grupo Etanol (Figura 9B) de 16 dias de vida. Nossas análises mostraram que não houveram diferenças significativas na largura (Figura 9C) e no comprimento do córtex cerebral entre animais controle ou com exposição pré-natal ao álcool.

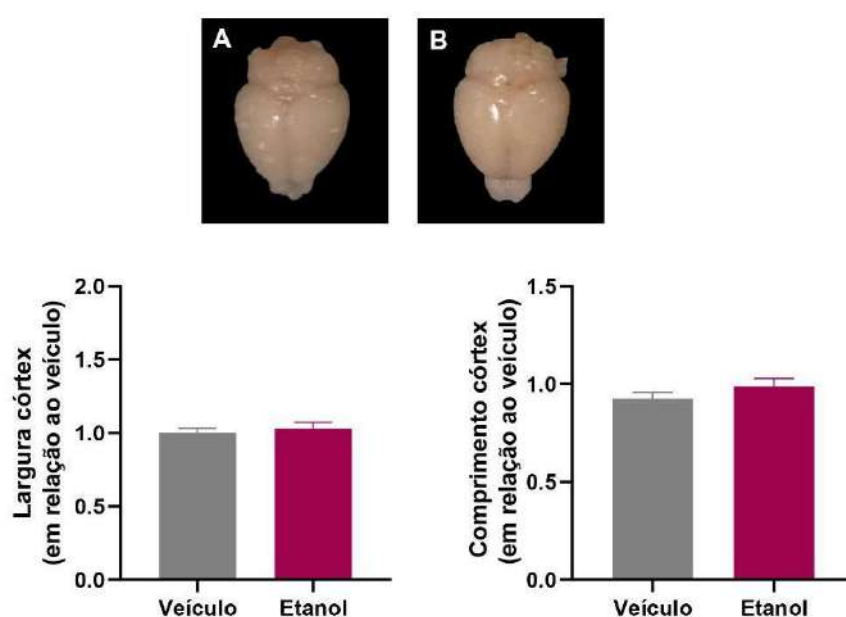


Figura 9: Análise macroscópica do córtex cerebral frente à PAE. Análise macroscópica dos encéfalos submetidos à veículo (A) ou etanol (B). Gráficos representativos da análise da largura (C) e comprimento (D) não revelam diferenças significativas entre os grupos. Veículo N = 9; Etanol N= 9.

11.2 Análise da excitabilidade cerebral frente à PAE

A fim de analisar a excitabilidade cerebral dos animais com PAE, realizamos a injeção sistêmica do antagonista de GABA A, pentilenotetrazol, e quantificamos o número de animais que apresenta cada fase da escala de Racine adaptada (dos Santos Heringer et al, 2022). Nossos resultados mostraram que os animais do mais animais do grupo etanol apresentavam a fase 4 e 6 das crises induzidas por PTZ. Entretanto, não houveram diferenças do número de animais que apresentou cada uma

das demais fases da escala de Racine adaptada entre os grupos veículo e Etanol (Figura 10A). A análise da duração das crises mostrou que não houve diferença entre os grupos veículo e etanol (Figura 10B). A análise da duração de cada fase de crise foi avaliada nas fases onde houveram 3 ou mais indivíduos apresentando esta fase nos grupos veículo e Etanol, o que ocorreu nas fases 1 (parada comportamental), 4 (crise clônica bilateral), 6 (crise tônica com manutenção postural) e 7 (crise tônica com perda postural). Nossas análises mostraram que, dentro do intervalo de 10 minutos avaliado, os animais do grupo Etanol apresentam maior duração da fase 6 em comparação ao grupo veículo (Figura 10E). Não foram encontradas diferenças nas análises da fase 1 (Figura 10C), 4 (Figura 10D) e 7 (Figura 10F). Uma vez que a crise induzida por PTZ envolve um mecanismo dependente exclusivamente do bloqueio da atividade inibitória, procedemos com a análise de uma crise convulsiva dependente de mecanismos diferentes, a crise febril (Mosili et al, 2020). Nossos resultados mostraram que o grupo etanol apresenta uma latência maior que o grupo Veículo para apresentar uma crise tônico-clônico generalizada quando submetido a hipertermia (Figura 10G).

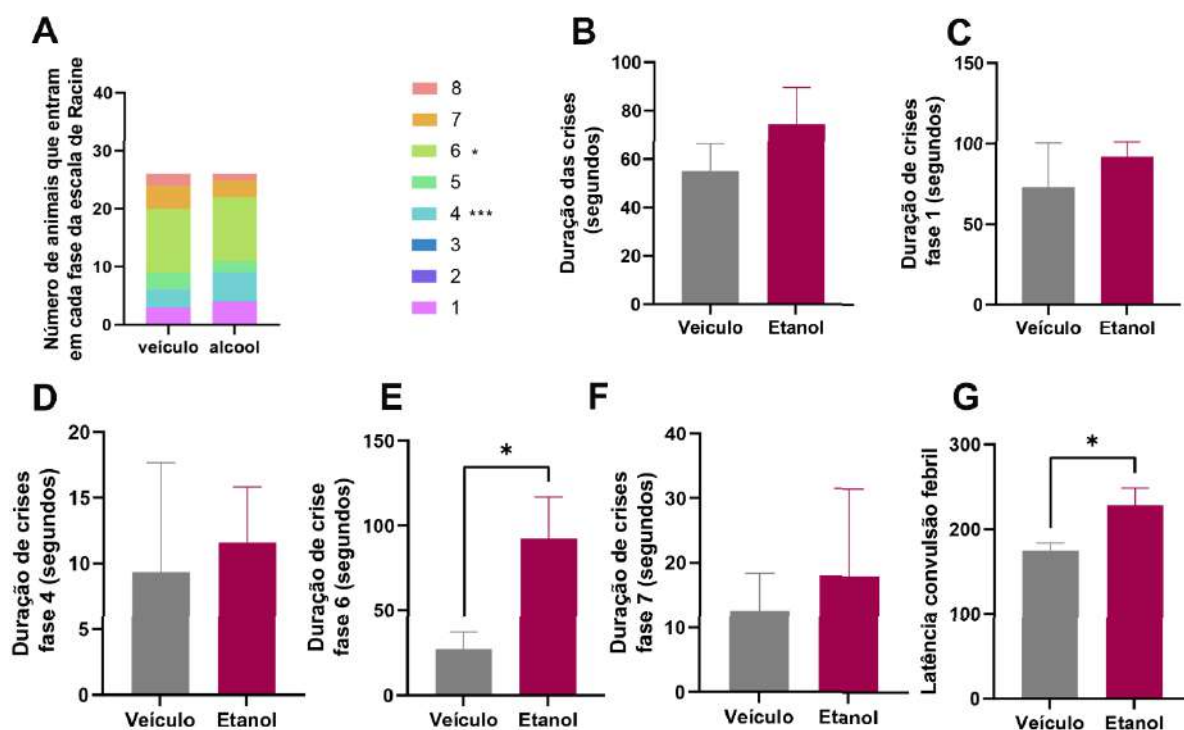


Figura 10: Análise da excitabilidade cerebral frente à PAE. (A) Gráfico representativo da análise do número de animais que entra em cada fase da escala de Racine modificada após injeção de PTZ. (B) Gráfico representativo da análise da duração total das crises. (C) Gráfico representativo da análise da duração das crises na fase 1. (D) Gráfico representativo da análise da duração das crises na fase 4.

(E) Gráfico representativo da análise da duração das crises na fase 6. (F) Gráfico representativo da análise da duração das crises na fase 6. (G) Gráfico representativo da análise da latência para convulsão febril. (N= 14 veículo; 14 etanol) * representa $P < 0,05$.

11.3 Análise da população de neurônios Parvalbumina +

A fim de analisar a população de interneurônios positivos para Parvalbumina, realizamos imunofluorescência. Nossas fotomicrografias mostraram que a marcação contra parvalbumina se faz presente no corpo celular e porção proximal dos dendritos dessa população de interneurônios, permitindo um processo de contagem de células (Figura 11). Nossos resultados mostraram que o grupo etanol apresenta mais células positivas para parvalbumina na espessura total do córtex (Figura 11A) e nas camadas supragranulares (Figura 11B), mas não nas camadas infragranulares (Figura 11C). A análise da razão da quantidade de células PV+ na camada supragranular sobre a infragranular mostrou uma maior razão no grupo etanol em comparação ao veículo (Figura 11D).

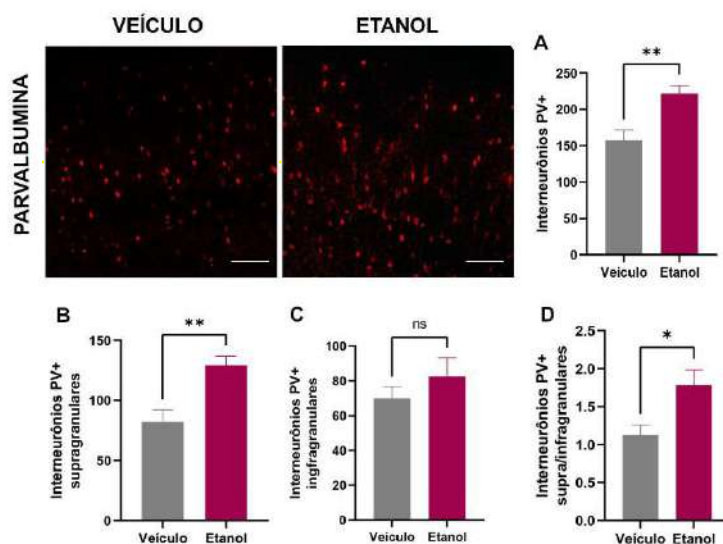


Figura 11: Análise da população de neurônios Parvalbumina +. Fotomicrografias representativas da imunofluorescência contra parvalbumina no córtex somatossensorial primário de animais tratados com veículo ou etanol. Linha amarela representa o limite entre camadas supra- e infragranulares. (A) Gráfico representativo da análise da contagem de células PV+ nas camadas totais, (B) supragranulares ou (C) infragranulares do córtex. (D) Gráfico representativo da análise da razão da quantidade de células PV+ na camada supragranular sobre a infragranular. Veículo N=6; Etanol N=6 * representa $P < 0,05$

11.4 Análise da população de neurônios Somatostatina +

A fim de analisar a população de interneurônios positivos para somatostatina, realizamos imunofluorescência. Nossas fotomicrografias mostraram que a marcação contra SOM se faz presente no corpo celular e porção proximal dos dendritos dessa população de interneurônios, permitindo um processo de contagem de células (Figura 12). Nossos resultados não mostraram diferenças na quantidade de células positivas para SOM na espessura total do córtex (Figura 12A), nas camadas supragranulares (Figura 12B) e nas camadas infragranulares (Figura 12C). A análise da razão da quantidade de células SOM+ na camada supragranular sobre a infragranular não mostrou diferença entre o grupo etanol e veículo (Figura 12D).

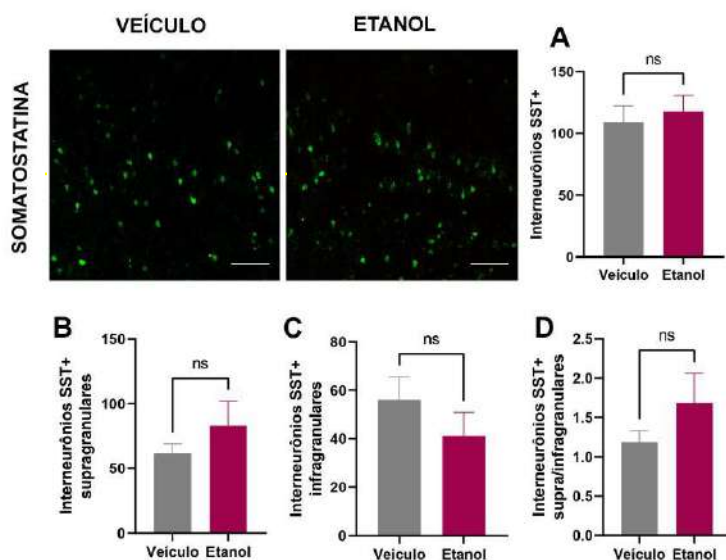


Figura 12: Análise da população de neurônios Somatostatina +. Fotomicrografias representativa da imunofluorescência contra somatostatina no córtex somatossensorial primário de animais tratados com veículo ou etanol. Linha amarela representa o limite entre camadas supra- e infragranulares. (A) Gráfico representativo da análise da contagem de células SOM+ nas camadas totais, (B) supragranulares (C) ou infragranulares do córtex. (D) Gráfico representativo da análise da razão da quantidade de células SOM+ na camada supragranular sobre a infragranular. Veículo N=6; Etanol N=6.

11.5 Análise da população de neurônios VIP +

A fim de analisar a população de interneurônios positivos para peptídeo vasoativo intestinal, realizamos imunofluorescência. Nossas fotomicrografias mostraram que a marcação contra VIP se faz presente no corpo celular e porção proximal dos dendritos dessa população de interneurônios, permitindo um processo de contagem de células (Figura 13). Nossos resultados não mostraram diferenças na quantidade de células positivas para VIP na espessura total do córtex (Figura 13A), nas camadas supragranulares (Figura 13B) e nas camadas infragranulares (Figura 13C). A análise da razão da quantidade de células VIP+ na camada supragranular sobre a infragranular não mostrou diferença entre o grupo + etanol e veículo (Figura 13D).

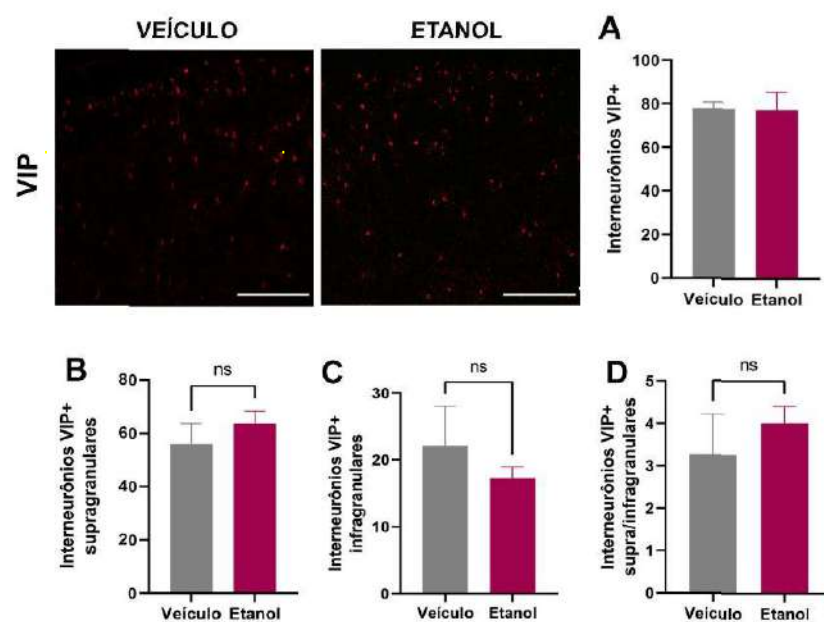


Figura 13: Análise da população de neurônios Peptídeo vasoativo intestinal +. Fotomicrografias representativa da imunofluorescência contra VIP no córtex somatossensorial primário de animais tratados com veículo ou etanol. Linha amarela representa o limite entre camadas supra- e infragranulares. (A) Gráfico representativo da análise da contagem de células VIP+ nas camadas totais, (B) supragranulares (C) ou infragranulares do córtex. (E) Gráfico representativo da análise da razão da quantidade de células VIP+ na camada supragranular sobre a infragranular. Veículo N=4; Etanol N=5.

12 DISCUSSÃO

A PAE pode resultar em alterações no neurodesenvolvimento, deste modo, impactando tanto a estrutura encefálica quanto a função neuronal (Guerri et al., 2009; Riley et al., 2011). No presente estudo, investigamos os efeitos da exposição pré-natal ao álcool no córtex em camundongos suíços durante o período pós-natal, com foco na morfologia do encéfalo, a excitabilidade neuronal e os subtipos de interneurônios inibitórios.

A avaliação macroscópica do córtex encefálico, no DPN16, não indicou diferenças significativas entre os grupos controle veículo e o etanol em relação à largura e ao comprimento encefálico. Esses dados indicam que a exposição ao álcool durante o desenvolvimento embrionário não comprometeu, de forma evidente, a estrutura morfológica do encéfalo nesta fase.

Em nosso trabalho, investigamos a excitabilidade neuronal utilizando duas abordagens, a convulsão febril e a convulsão mediada por PTZ, que é um antagonista dos receptores GABA A, bastante conhecido por induzir crises convulsivas. Nossos resultados mostraram, que os animais expostos ao etanol apresentaram maior frequência na fase 4 (crise clônica bilateral) e a 6 (crise tônica com manutenção postural) da escala de Racine adaptada, demonstrando que há maior vulnerabilidade às crises pela inibição GABAérgica (dos Santos Heringer et al., 2022). Adicionalmente, embora a duração total das crises não tenha apresentado diferença entre os grupos, a fase 6, considerada uma fase de grande relevância, foi significativamente mais prolongada nos animais expostos ao etanol. Entretanto, em um modelo de análise por crise febril, mediado por mecanismos distintos da neurotransmissão GABAérgica os animais do grupo etanol mostram maior latência para a manifestação da criseônico-clônica generalizada, sugerindo alterações em circuitos neuronais que regulam a resposta à hipertermia (Mosili et al., 2020).

Já a análise dos interneurônios foi realizada através da marcação por imunofluorescência, focando em três subtipos principais de interneurônios inibitórios: PV+, STT + e VIP+. Foi encontrado um aumento significativo na densidade de células PV+ na espessura total do córtex e, especialmente, nas camadas supra granulares dos animais expostos ao etanol. A razão entre as camadas supra

granular/infragranular também foi maior nesse grupo, indicando uma possível redistribuição laminar dessa população neuronal. Por outro lado, não foram identificadas diferenças na densidade de interneurônios STT+ e VIP+ entre os grupos, tanto na espessura total do córtex quanto em suas subcamadas.

12.1 PAE e microcefalia

A exposição pré-natal ao álcool pode ocasionar déficits no desenvolvimento encefálico de crianças que foram expostas ao álcool. E esse acometimento pode provocar a FASD, que abrange diversas características, dentre elas, a microcefalia que pode ocorrer devido a ação do álcool. E isso gera atrasos no desenvolvimento, dismorfias craniofaciais, além de distúrbios cognitivos e comportamentais (Treit et al., 2016).

Em nosso estudo, observamos que a exposição ao álcool no período de E14-E19 em camundongos gestantes, não afetou de forma significativa o comprimento e a largura encefálica quando avaliado no 16º dia pós-natal (DPN16). Contudo, a literatura mostra que a exposição ao álcool durante a gestação pode comprometer o desenvolvimento da circunferência encefálica, visto que, o etanol é um agente teratogênico, e apresenta a capacidade de alterar os processos fundamentais da neurogênese, como a migração celular e a maturação neuronal (Treit et al., 2016).

Siqueira e colaboradores mostraram utilizando o mesmo protocolo empregado em nosso estudo, que no DPN 0, o córtex cerebral era mais fino, e o encéfalo apresentava um peso menor no grupo etanol quando comparado ao grupo veículo (Siqueira et al, 2021). É possível, que ao longo dos 16 dias que separam nossa análise da análise de Siqueira et al, alguns processos, como proliferação de células gliais e diferenciação celular seja responsável por compensar as perdas iniciais da PAE.

Outro aspecto relevante relacionado ao desenvolvimento encefálico refere-se à vascularização cerebral. Estudos indicam que a exposição ao etanol prejudica a formação da rede vascular cortical e interfere no papel das células endoteliais e dos astrócitos perivasculares, que são cruciais na manutenção da barreira hematoencefálica (Siqueira et al., 2021). A integridade dessa barreira é essencial para

a homeostase e a proteção do encéfalo em desenvolvimento. A vascularização adequada e a interação eficiente entre o endotélio e os astrócitos são fundamentais para o desenvolvimento cortical. A disfunção nesse processo tem sido associada a déficits cognitivos e estruturais observados em indivíduos com FASD (Siqueira et al., 2021).

A avaliação morfológica pode indicar prejuízos associados à exposição ao álcool, os quais interferem diretamente no funcionamento neurocognitivo, mesmo quando não há microcefalia. Assim, mesmo com circunferência encefálica dentro dos padrões de normalidade, podem existir alterações significativas na conectividade neural e na organização funcional do encéfalo. A heterogeneidade dos efeitos do álcool sobre o sistema nervoso central pode justificar por que alguns indivíduos apresentam déficits cognitivos graves, mesmo com medidas cranianas normais, dificultando a intervenção precoce (Treit et al., 2016).

Além das alterações morfológicas, a exposição ao álcool provoca desregulação de genes relacionados a processos biológicos essenciais, como o ciclo celular e a apoptose. Essa resposta indica que as células reagem ao agente tóxico ativando mecanismos compensatórios de proliferação celular e/ou morte celular programada, o que pode comprometer a neurogênese e a adequada organização das camadas corticais (Sambo et al., 2024).

No ponto de vista neurobiológico, os efeitos do etanol sobre o desenvolvimento encefálico decorrem de diversos mecanismos, incluindo estresse oxidativo, alterações na sinalização de fatores neurotróficos e apoptose neural exacerbada. Tais efeitos comprometem o volume do líquido encefálico, o corpo caloso, o cerebelo e o córtex pré-frontal — áreas cruciais para a cognição, a memória e o controle comportamental (Treit et al., 2016).

Estudos demonstram que o álcool induz estresse metabólico no encéfalo, prejudicando os sistemas de suporte energético e comprometendo o crescimento e a maturação encefálica. E devido a essa ação, há uma necessidade de ativação compensatória de vias relacionadas ao ciclo celular, seguida de desregulação metabólica, que pode limitar o crescimento e a funcionalidade encefálica. Esses achados reforçam a importância de estratégias preventivas frente à exposição pré-

natal ao álcool, além de indicarem a necessidade de intervenções considerando os períodos de maior vulnerabilidade do encéfalo em desenvolvimento (Sambo et al., 2024).

Dessa forma, uma abordagem diagnóstica em crianças com suspeita de exposição pré-natal ao álcool deve ser multidimensional, considerando aspectos morfológicos, funcionais e comportamentais, a fim de se obter uma compreensão mais precisa dos déficits envolvidos.

12.2 PAE e excitabilidade cerebral

A literatura aponta que a exposição pré-natal ao etanol (PAE) está associada ao aumento da prevalência de transtornos convulsivos. No estudo de Cho et al. (2017), os autores investigaram se uma única administração de etanol no final da gestação aumentaria a suscetibilidade a convulsões induzidas por agonistas dos receptores NMDA. Os resultados demonstraram que a exposição ao etanol interfere nos circuitos excitatórios e inibitórios mediados por receptores NMDA e GABA, promovendo hiperexcitabilidade. Essa modulação sináptica localizada no estágio embrionário (E18) pode alterar de forma duradoura o limiar convulsivo neonatal.

Em nosso trabalho, também foram realizados testes de suscetibilidade à indução de crises convulsivas por PTZ. Os resultados indicaram que os animais expostos ao etanol apresentaram maior frequência de ocorrência das fases 4 e 6, sugerindo maior suscetibilidade à hiperexcitabilidade neuronal. Similarmente, a duração da fase 6 se mostrou aumentada no grupo Etanol, revelando um aumento na severidade às crises provocadas por PTZ. No entanto, quando analisada a duração total das crises, não se observaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. Realizamos também uma análise complementar baseada em um modelo de crise febril, que envolve mecanismos distintos (Mosili et al., 2020). Nessa análise, observou-se que os animais do grupo etanol apresentaram uma latência significativamente maior para o início da crise tônico-clônica generalizada quando submetidos à hipertermia. Tendo em vista que o PTZ age bloqueando a neurotransmissão inibitória mediada por GABA A, enquanto a crise febril envolve uma maior ativação neuronal inespecífica mediada, entre outros por ativação de receptores TRPV3, que é um canal iônico sensível ao calor, e tem a capacidade de ser ativado

por uma temperatura de 32-29°C, e expressa resposta progressiva a estímulos térmicos repetidos, e também pode ser ativado por agonistas químicos. (Shen et al., 2024). Hipotetizamos que haja uma maior contribuição inibitória no grupo etanol, o que reduziria a excitabilidade na ativação febril, mas resultaria em uma maior desinibição mediada por PTZ, aumentando a severidade das crises.

12.3 O etanol compromete o equilíbrio entre os sistemas de neurotransmissão

E/I, esses mecanismos são importantes para a plasticidade sináptica e o funcionamento cognitivo. Estudos demonstram que o álcool atua como agonista dos receptores gabaérgico e antagonista dos receptores NMDA, modulando de forma aguda a atividade sináptica (Arzua et al., 2024). Essa modulação interfere no desenvolvimento de circuitos neurais que, se expostos em períodos críticos, podem sofrer alterações permanentes.

Em estudo conduzido por Arzua et al. (2024), camundongos recém-nascidos expostos ao etanol no sétimo dia pós-natal (P7) apresentaram, na fase adulta (P60), redução na frequência das correntes excitatórias pós-sinápticas e aumento das correntes inibitórias nos neurônios da região CA1 do hipocampo. Tal padrão eletrofisiológico revela um desequilíbrio sináptico em favor da inibição, o que pode comprometer o funcionamento de redes neurais envolvidas em memória e aprendizagem.

Ainda segundo os autores, esse desequilíbrio E/I não se limita aos efeitos agudos do etanol, mas resulta de uma cascata prolongada de eventos neurobiológicos, como apoptose precoce, adaptação sináptica desregulada e disfunção mitocondrial. Esses mecanismos têm sido amplamente relacionados à excitabilidade glutamatérgica exacerbada e ao estresse oxidativo induzido pelo álcool, consolidando a mitocôndria como um dos principais alvos da neurotoxicidade alcoólica (Arzua et al., 2024).

Adicionalmente, o estudo de Delatour et al. (2019) investigou os efeitos do etanol na atividade sináptica de neurônios piramidais das camadas V e VI do córtex somatossensorial de camundongos na puberdade (P28–P32). Observou-se aumento na densidade e modificações na morfologia das espículas dendríticas apicais,

indicando reorganização estrutural sináptica decorrente de mecanismos de plasticidade adaptativa à exposição etanólica. Tais alterações sustentam um desequilíbrio persistente entre os sistemas excitatório e inibitório, promovido por mecanismos pré-sinápticos e remodelação morfológica.

De forma geral, os achados do presente trabalho, somados à literatura revisada, indicam que a exposição ao etanol em períodos críticos do desenvolvimento interfere profundamente na arquitetura sináptica, na função mitocondrial e na excitabilidade neuronal. Essas alterações culminam em déficits comportamentais e aumentam a suscetibilidade a convulsões, contribuindo para o avanço do entendimento fisiopatológico do FASD e apontando possíveis alvos terapêuticos centrados na modulação sináptica e na proteção mitocondrial

12.4 PAE e neurônios inibitórios

Diversos estudos demonstram que a exposição pré-natal ao álcool tem a capacidade de provocar alterações no desenvolvimento nervoso central em formação, podendo afetar tanto a angiogênese — processo responsável pela formação de novos vasos sanguíneos — quanto a migração de interneurônios GABAérgicos. A presença de etanol pode comprometer a migração desses interneurônios para as camadas profundas do córtex (Léger et al., 2020).

Sabe-se que o GABA atua como neurotransmissor despolarizante em interneurônios durante o desenvolvimento inicial, devido à predominância do cotransportador NKCC1 (Sodium-Potassium-Chloride Cotransporte), que é uma proteína transportadora que desempenha um papel crucial na regulação do equilíbrio de íons cloreto, em várias células e tecidos do corpo. A presença de etanol intensifica essa resposta despolarizante, promovendo maior ativação dos canais de cálcio tipo L, que desempenham um papel fundamental na regulação da entrada de cálcio para o interior da célula. Esse processo afeta a motilidade e a dinâmica do citoesqueleto neuronal, que são essenciais para a migração tangencial. Alterações nessa migração promovem desequilíbrios na arquitetura cortical, como o aumento da densidade de interneurônios PV em camadas profundas do córtex adulto, contribuindo para déficits executivos, emocionais e cognitivos — características associadas ao transtorno do espectro alcoólico fetal (Lee et al., 2022).

Os dados obtidos em nosso estudo demonstraram que os interneurônios positivos para parvalbumina apresentaram maior densidade celular na espessura total do córtex e nas camadas supragranulares no grupo exposto ao etanol, em comparação ao grupo controle. No entanto, essa diferença não foi observada nas camadas infragranulares. Por outro lado, os interneurônios positivos para somatostatina ou VIP não apresentaram variações significativas entre os grupos tratados com etanol e água.

Por outro lado, Licheri et al. (2023) investigaram os efeitos de longo prazo da exposição pré-natal moderada ao álcool sobre os interneurônios GABAérgicos no córtex parietal posterior de camundongos adultos. Os resultados revelaram uma redução na densidade de interneurônios positivos para parvalbumina nessa região, independentemente do sexo dos animais, sugerindo uma vulnerabilidade seletiva dessa população neuronal. Os autores propuseram um possível mecanismo compensatório na rede neural, possivelmente mediado por outras populações inibitórias ou por plasticidade sináptica adaptativa. Tais alterações podem comprometer circuitos relacionados ao controle inibitório, à atenção e à sincronização sensorial, afetando negativamente o comportamento dos indivíduos. A redução de neurônios PV também pode refletir uma perturbação na arquitetura mitocondrial, fator crítico para o funcionamento executivo. A integridade estrutural dos interneurônios PV é essencial para o equilíbrio entre excitação e inibição, sendo fundamental para evitar estados de hiperexcitabilidade, como epilepsia e transtornos de atenção (Licheri et al., 2023).

A população de interneurônios GABAérgicos desempenha um papel crucial na manutenção do equilíbrio excitatório-inibitório e na prevenção de estados de hiperexcitabilidade cortical, incluindo as crises epiléticas (Zhong et al., 2021). Por meio de registros eletrofisiológicos, observou-se uma redução significativa na frequência e na amplitude das correntes inibitórias pós-sinápticas GABAérgicas, mesmo nos circuitos residuais. A perda da atividade desses interneurônios pode comprometer a geração de ritmos oscilatórios coordenados e a inibição de disparos excessivos em neurônios piramidais excitatórios. Essa disfunção sináptica ocorre sem alterações expressivas na expressão de genes relacionados à síntese, transporte ou receptores de GABA, sugerindo que o comprometimento ocorre predominantemente

em níveis pós-sinápticos, possivelmente devido à desorganização da arquitetura sináptica ou à deficiência na maturação dos receptores (Zhong et al., 2021).

Adicionalmente, a exposição ao etanol durante o período neonatal em modelos murinos têm sido amplamente utilizada como modelo experimental para simular o consumo excessivo de álcool no terceiro trimestre da gestação humana. Esses estudos demonstram que tal exposição resulta em um quadro de neurodegeneração aguda, seguido por alterações neuroanatômicas e déficits comportamentais duradouros (Saito et al., 2023). Os achados reforçam a hipótese de que o etanol atua de forma disruptiva nos processos de maturação neuronal, incluindo migração, diferenciação e organização sináptica, especialmente sobre interneurônios GABAérgicos, os quais são essenciais para o estabelecimento de circuitos neurais funcionais.

Portanto, os dados discutidos evidenciam que a exposição pré natal ao etanol compromete profundamente a formação e a funcionalidade de redes inibitórias no córtex cerebral, particularmente por meio de alterações na distribuição e no funcionamento dos interneurônios positivos para parvalbumina. Tais alterações contribuem para a perda do equilíbrio excitatório-inibitório, estado que pode culminar em distúrbios do neurodesenvolvimento, incluindo déficits cognitivos, alterações comportamentais, prejuízo na regulação emocional e maior suscetibilidade a transtornos neurológicos, como epilepsia. Esses achados destacam a importância de políticas públicas de conscientização sobre os riscos do consumo de álcool durante a gestação, bem como a necessidade de estudos que explorem estratégias terapêuticas para mitigar os impactos neurobiológicos da exposição fetal ao etanol.

12.5 Neurotransmissão inibitória e excitabilidade cerebral

Uma das análises realizadas em nosso trabalho abordou os efeitos da PAE sobre a neurotransmissão inibitória e a excitabilidade neuronal. Esses mecanismos são profundamente afetados pela exposição ao etanol durante o desenvolvimento embrionário, e a epilepsia é uma das manifestações clínicas mais recorrentes nesses indivíduos. Essa condição representa um sério problema de saúde pública, afetando aproximadamente 10% da população mundial total em algum momento da vida (Bahadoran et al., 2025).

Com o objetivo de investigar a suscetibilidade convulsiva, utilizamos o modelo de indução de crises epiléticas por PTZ, um composto químico amplamente utilizado em pesquisas experimentais. O PTZ atua como um antagonista não competitivo do receptor GABA A, promovendo desequilíbrio entre os sistemas excitatórios e inibitórios do sistema nervoso central (Monteiro et al., 2024).

Segundo Monteiro et al. (2024), a administração intraperitoneal única de PTZ, em doses entre 50 a 80 mg/kg, desencadeia rapidamente crises convulsivas, que evoluem de manifestações motoras leves, como mióclonia, até episódios de convulsão tônico-clônica generalizada. Em nosso trabalho, utilizamos uma dose de 80 mg/kg em animais na fase DPN16 para avaliar a excitabilidade neuronal. O PTZ possui ação proeminente sobre o córtex e o hipocampo, regiões vulneráveis à excitotoxicidade. Modelos com essa substância têm demonstrado degeneração neuronal nas regiões CA1 e CA3 do hipocampo, associada à perda sináptica, morte de interneurônios GABAérgicos e disfunções mitocondriais (Monteiro et al., 2024).

Os interneurônios GABAérgicos compõem uma classe essencial de neurônios inibitórios, sendo responsáveis pela regulação da excitabilidade e pela manutenção do equilíbrio nos circuitos neurais. Por sua vez, os neurônios glutamatérgicos, predominantemente excitatórios, formam as principais vias de projeção do neocórtex. A liberação de GABA por interneurônios GABAérgicos modula a transmissão sináptica local, desempenhando papel essencial na modulação da atividade cortical (Tremblay et al., 2016).

Quando há bloqueio da atividade inibitória mediada por GABA, pelo uso do PTZ, há uma desinibição generalizada, desenfreado a excitabilidade glutamatérgica. Assim, o PTZ promove ativação indireta dos receptores NMDA, aumentando o fluxo de íons cálcio e sódio, o que culmina no surgimento do aumento no potencial de ação. Essa cascata leva a um estado de hiperexcitabilidade neuronal, crucial tanto para o desencadeamento da crise convulsiva aguda quanto para o processo de epileptogênese em exposições repetidas (Monteiro et al., 2024).

Durante o neurodesenvolvimento, os interneurônios GABAérgicos seguem trajetórias migratórias específicas, originadas das eminências ganglionares. Alterações nesse processo podem comprometer a formação de circuitos inibitórios.

Dentre os subtipos mais estudados destacam-se os interneurônios que expressam PV, SST e VIP (Tremblay et al., 2016).

A parvalbumina caracteriza-se por sua rápida resposta e alta frequência de disparo, desempenhando funções cruciais em processos cognitivos como atenção e memória. No contexto da epilepsia, a perda ou disfunção desses interneurônios está associada ao desequilíbrio da relação E/I, sendo observadas alterações tanto na densidade quanto na morfologia e conectividade desses neurônios em modelos epiléticos animais e humanos (Leitch et al., 2024). Os interneurônios PV+ participam ativamente dos circuitos córtico-talâmicos (CTC), cuja desregulação está relacionada a episódios de ausência comportamental. Esses neurônios representam entre 20% e 50% da população inibitória cortical, especializados em disparos rápidos e modulação precisa da atividade excitatória (Leitch et al., 2024).

Os interneurônios PV+ e SST+ são encontrados entre as camadas II e V, predominando nas camadas IV e V, enquanto os neurônios VIP+ predominam nas camadas II e III (Gentet et al., 2012). Nossos resultados demonstraram um aumento significativo de células PV+ no grupo exposto ao etanol, especialmente nas camadas supragranulares, sugerindo uma alteração na distribuição desses interneurônios.

Do ponto de vista funcional, a inibição promovida por interneurônios PV+ ocorre no corpo celular dos neurônios piramidais, regulando a ativação final desses neurônios de projeção em posição ótima para impedir o disparo de seus potenciais de ação e ativação de alvos em outras regiões corticais e subcorticais. Assim, a inibição mediada por interneurônios PV+ regula a saída de informação do córtex para alvos corticais e sub-corticais. Os interneurônios SST+, por sua vez, agem nos dendritos apicais, regulando a integração sináptica. Essa ação é mais prolongada e está envolvida na plasticidade sináptica, em contraste com a ação rápida dos PV+ (Tremblay et al., 2016; Parrish et al., 2019). Os interneurônios SST+ também desempenham papel importante na modulação da atividade dendrítica, controlando a entrada de estímulos excitatórios específicos. Por fim, o VIP atua predominantemente de forma indireta, inibindo outros interneurônios, como os SST+, exercendo, portanto, um papel desinibitório (Tremblay et al., 2016).

Nossos resultados mostram que o aumento da população de neurônios PV+, especialmente em camadas supragranulares, se mostrou correlacionar com uma alteração da excitabilidade, com aumento da severidade de crises mediadas por PTZ, associada a uma aumentada latência para crise febril. Esses achados sugerem uma adaptação do sistema, com aumento homeostático da excitação para contrabalançar o aumento da população inibitória. Quando inibida por PTZ, os circuitos excitatórios escalonados promoveriam um aumento de severidade de convulsão. Quando estimulados por temperatura, a inibição aumentada protegeria contra um aumento da probabilidade convulsiva. Tais hipóteses trazidas pelo presente trabalho precisam ser testadas, e esse aumento das sinapses excitatórias testadas experimentalmente para fins de confirmação.

13 CONCLUSÃO

Nosso estudo demonstrou que a exposição PAE é capaz de gerar alterações funcionais e celulares relevantes no córtex cerebral em desenvolvimento, mesmo que nossos resultados não mostraram alterações morfológicas macroscópicas evidentes. A análise da excitabilidade cerebral indicou maior suscetibilidade às crises induzidas por PTZ em animais expostos ao etanol, especialmente nas fases mais graves da escala de Racine, sugerindo uma vulnerabilidade aumentada associada à desregulação da neurotransmissão inibitória.

As análises dos interneurônios mostraram um aumento na densidade de células positivas para PV+ nas camadas supragranulares do córtex de animais com exposição pré-natal ao álcool, e isso pode induzir um mecanismo compensatório excitatório na organização cortical, enquanto os interneurônios que expressam a somatostatina SST+ e peptídeo intestinal vasoativo VIP+ não mostraram diferenças significativas.

Nosso estudo contribuiu para compreender os mecanismos que levam às alterações neurológicas observadas em indivíduos acometidos pela FASD. Futuras investigações devem explorar mais estas alterações ao longo do desenvolvimento, bem como a possibilidade de estratégias terapêuticas voltadas à modulação da atividade inibitória como forma de minimizar os efeitos adversos da PAE.

14 REFERÊNCIAS:

Arzua T, Yan Y, Liu X, Dash RK, Liu QS, Bai X. Synaptic and mitochondrial mechanisms behind alcohol-induced imbalance of excitatory/inhibitory synaptic activity and associated cognitive and behavioral abnormalities. **Transl Psychiatry**. 2024 Jan 22;14(1):51. doi: 10.1038/s41398-024-02748-8. PMID: 38253552; PMCID: PMC10803756.

Bahadoran, E. et al. (2025). Bavachinin attenuates pentylenetetrazol-induced seizures through antioxidant and anti-inflammatory mechanisms in adult male mice. **Functional Food Science**, 5(5), 182–193

Bell SH, Stade B, Reynolds JN, Rasmussen C, Andrew G, Hwang PA, Carlen PL. The remarkably high prevalence of epilepsy and seizure history in fetal alcohol spectrum disorders. **Alcohol Clin Exp Res**. 2010 Jun;34(6):1084-9. doi: 10.1111/j.1530-0277.2010.01184.x. Epub 2010 Apr 5. PMID: 20374205

Ben-Ari Y, Gaiarsa JL, Tyzio R, Khazipov R. GABA: a pioneer transmitter that excites immature neurons and generates primitive oscillations. **Physiol Rev**. 2007 Oct;87(4):1215-84. doi: 10.1152/physrev.00017.2006. PMID: 17928584.

Ben-Ari, Y. (2014). The GABA excitatory/inhibitory developmental sequence: A personal journey. **Neuroscience**, 279, 187-219.

Bystron, I., Blakemore, C., & Rakic, P. (2008). Development of the human cerebral cortex: Boulder Committee revisited. **Nature Reviews Neuroscience**, 9(2), 110–122. <https://doi.org/10.1038/nrn2252>

Bystron, I., Blakemore, C., & Rakic, P. (2008). Development of the human cerebral cortex: Boulder Committee revisited. **Nature Reviews Neuroscience**, 9(2), 110-122.

Cardin, J. A., Carlen, M., Meletis, K., Knoblich, U., Zhang, F., Deisseroth, K., ... & Moore, C. I. (2009). Driving fast-spiking cells induces gamma rhythm and controls sensory responses. **Nature**, 459(7247), 663–667. <https://doi.org/10.1038/nature08002>

CASSANO PA, KOEPESELL TD, FARWELL JR. Risk of febrile seizures in childhood in relation to prenatal maternal cigarette smoking and alcohol intake. **Am J Epidemiol.** 1990

Cellot G, Cherubini E. GABAergic signaling as therapeutic target for autism spectrum disorders. **Front Pediatr.** 2014 Jul 8;2:70. doi: 10.3389/fped.2014.00070. PMID: 25072038; PMCID: PMC4085902.

Cho SJ, Newton J, Li T, Khandai P, Luta G, Lovinger DM, N'Gouemo P. Prenatal alcohol exposure in the second trimester-equivalent increases the seizure susceptibility in developing rats. **Alcohol.** 2020 Jun;85:153-164. doi: 10.1016/j.alcohol.2020.01.005. Epub 2020 Feb 28. PMID: 32114257; PMCID: PMC7340347

Cho, S. J., Lovinger, D. M., & N'Gouemo, P. (2017). Prenatal alcohol exposure enhances the susceptibility to NMDA-induced generalized tonic-clonic seizures in developing rats. **CNS neuroscience & therapeutics**, 23(10), 808–817. <https://doi.org/10.1111/cns.12756>

Cho, S. J., Newton, J., Li, T., Khandai, P., Luta, G., Lovinger, D. M., & N'Gouemo, P. (2020). Prenatal alcohol exposure in the second trimester-equivalent increases the seizure susceptibility in developing rats. **Alcohol (Fayetteville, N.Y.)**, 85, 153–164. <https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2020.01.005>

Cook, J. L., Green, C. R., Lilley, C. M., Anderson, S. M., Baldwin, M. E., Chudley, A. E., ... & Rosales, T. (2016). Fetal alcohol spectrum disorder: a guideline for diagnosis across the lifespan. **CMAJ**, 188(3), 191-197. <https://doi.org/10.1503/cmaj.141593>

COSTA, SAVAGE DD, VALENZUELA CF. A review of the effects of prenatal or early postnatal ethanol exposure on brain ligand-gated ion channels. **Alcohol Clin Exp Res.** 2000

DeFelipe, J., Alonso-Nanclares, L., & Arellano, J. I. (2002). Microstructure of the neocortex: comparative aspects. *Journal of Neurocytology*, **31**, 299–316. <https://doi.org/10.1023/A:1024130211265>

Delatour LC, Yeh PWL, Yeh HH. Prenatal Exposure to Ethanol Alters Synaptic Activity in Layer V/VI Pyramidal Neurons of the Somatosensory **Cortex**. *Cereb Cortex*. 2020 Mar 14;30(3):1735-1751. doi: 10.1093/cercor/bhz199. PMID: 31647550; PMCID: PMC7132917.

Donald, K. A., Eastman, E., Howells, F. M., Adnams, C., Riley, E. P., & Woods, R. P. (2015). Neuroimaging effects of prenatal alcohol exposure on the developing human brain: A magnetic resonance imaging review. *Acta Neuropsychiatrica*, 27(5), 251–269. <https://doi.org/10.1017/neu.2015.6>

DONATO, F. et al. Parvalbumin-expressing basket-cell network plasticity induced by experience regulates adult learning. *Nature*, v. 504, n. 7479, p. 272–276, 2013.

dos Santos Heringer, L., Pimenta, A. C. S., Martins, G. J., & Moreira, F. A. (2022). Neonatal alcohol exposure increases seizure susceptibility and alters cortical interneuron distribution in mice. *Neuropharmacology*, 208, 108948. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2022.108948>

Dos Santos Heringer, L., Rios Carvalho, J., Teixeira Oliveira, J., Texeira Silva, B., de Souza Aguiar Dos Santos, D. M., Martinez Martinez Toledo, A. L., Borges Savoldi, L. M., Magalhães Portela, D., Adriani Marques, S., Campello Costa Lopes, P., Blanco Martinez, A. M., & Rocha Mendonça, H. (2022). Altered excitatory and inhibitory neocortical circuitry leads to increased convulsive severity after pentylenetetrazol injection in an animal model of schizencephaly, but not of microgyria. *Epilepsia open*, 7(3), 462–473. <https://doi.org/10.1002/epi4.12625>

Ekanem, N. B., Reed, L. K., Weston, N., & Jacobs, K. M. (2019). Enhanced responses to somatostatin interneuron activation in developmentally malformed cortex. *Epilepsia open*, 4(2), 334–338. <https://doi.org/10.1002/epi4.12316>

FABBRI, C. E., FURTADO, E. F., & LAPREGA, M. R (2007). Consumo de álcool na gestação: desempenho da versão brasileira do questionário T-ACE. **Revista de Saúde Pública**

FEE, C.; BALSLEV, D.; SEELEY, W. W. Somatostatin-positive interneuron deficits in depression: cortical microcircuit and therapeutic perspectives. **Biological Psychiatry**, v. 82, n. 8, p. 549-559, 2017.

FISHER RS, ACEVEDO C, ARZIMANOGLU A, BOGACZ A, CROSS JH, ELGE CE, ENGER J JR, FORSGREN L, FRENCH JA, GLYNN M, HESDORFFER DC, LEE BI, MATHERN GW, MOSHÉ SL, PERUCCA E, SCHEFFER IE, TOMSON T, WATANABE M, WIEBE S. ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy. **Epilepsia**. 2014

Gentet LJ. Functional diversity of supragranular GABAergic neurons in the barrel cortex. **Front Neural Circuits**. 2012 Aug 17;6:52. doi: 10.3389/fncir.2012.00052. PMID: 22912602; PMCID: PMC3421449.

Gilmore EC, Herrup K. Neocortical cell migration: GABAergic neurons and cells in layers I and VI move in a cyclin-dependent kinase 5-independent manner. **J Neurosci**. 2001 Dec 15;21(24):9690-700. doi: 10.1523/JNEUROSCI.21-24-09690.2001. PMID: 11739578; PMCID: PMC6763059.

Godin-Agé, T., Jacobson, S. W., Meintjes, E. M., Molteno, C. D., & Jacobson, J. L. (2021). Epileptogenesis following prenatal alcohol exposure: Mechanisms and clinical implications. **Neurotoxicology and Teratology**, 86, 106980. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2021.106980>

Godin-Aguerre, H., et al. (2021). Ethanol impairs tangential migration of cortical interneurons by disrupting actomyosin dynamics. **Cerebral Cortex**, 31(4), 2319–2334. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhaa351>

Guerri, C., Bazinet, A., & Riley, E. P. (2009). Fetal Alcohol Spectrum Disorders and alterations in brain and behavior. **Alcohol and Alcoholism**, 44(2), 108-114. <https://doi.org/10.1093/alcalc/agn105>

Guerri, C., Bazinet, A., & Riley, E. P. (2009). Fetal Alcohol Spectrum Disorders and Alterations in Brain and Behavior. **Alcohol Research & Health**, 32(1), 100–106.

Guerri, C., Bazinet, A., & Riley, E. P. (2009). Foetal Alcohol Spectrum Disorders and alterations in brain and behaviour. **Alcohol and Alcoholism**, 44(2), 108–114. <https://doi.org/10.1093/alcalc/agn105>

Guerriero RM, Giza CC, Rotenberg A. Glutamate and GABA imbalance following traumatic brain injury. **Curr Neurol Neurosci Rep**. 2015 May;15(5):27. doi: 10.1007/s11910-015-0545-1. PMID: 25796572; PMCID: PMC4640931.

HARRIS, K. D.; SHEPHERD, G. M. The neocortical circuit: themes and variations. **Nature Neuroscience**, v. 18, p. 170-181, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.10.009>

HU, H.; GANJOO, A.; SOMOGYI, P. Fast-spiking, parvalbumin+ GABAergic interneurons: From cellular design to microcircuit function. **Science**, v. 345, n. 6196, p. 1255263, 2014.

Hu, J. S., Malik, R., Sohal, V. S., Rubenstein, J. L., & Vogt, D. (2023). *Tsc1* Loss in VIP-Lineage Cortical Interneurons Results in More VIP+ Interneurons and Enhanced Excitability. **Cells**, 13(1), 52. <https://doi.org/10.3390/cells13010052>

HUBEL, D. H.; WIESEL, T. N. The period of susceptibility to the physiological effects of unilateral eye closure in kittens. **The Journal of Physiology**, v. 206, n. 2, p. 419-436, 1970.

Huganir, R. L., & Nicoll, R. A. (2013). AMPA receptor trafficking and the control of synaptic transmission. **Nature Reviews Neuroscience**, 14(11), 700–714.

ISAACSON, J. S.; SCANZIANI, M. How inhibition shapes cortical activity. **Neuron**, v. 72, n. 2, p. 231-243, 2011.

Johnson, S. B., Riikonen, R., & Truedsson, L. (2018). Fetal Alcohol Spectrum Disorders: Neurodevelopmental and Behavioral Aspects. **Current Developmental Disorders Reports**, 5(4), 195–203. <https://doi.org/10.1007/s40474-018-0154-5>

JOHNSON, T. B. et al. The effects of prenatal alcohol exposure on the developing brain. **Neuropsychology Review**, v. 28, p. 202-222, 2018.

Jones, K. L., & Smith, D. W. (1973). Recognition of the fetal alcohol syndrome in early infancy. **The Lancet**, 302(7836), 999-1001. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(73\)91092-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(73)91092-1)

KARNANI, M. M. et al. Cooperative subnetworks of molecularly similar interneurons in mouse neocortex. **Neuron**, v. 90, n. 1, p. 86-100, 2016.

KATZNER, S. et al. Local origin of field potentials in visual cortex. **Neuron**, v. 61, p. 35-41, 2011.

KAWAGUCHI, Y.; KUBOTA, Y. Physiological and morphological identification of somatostatin- or vasoactive intestinal polypeptide-containing cells among GABAergic cell subtypes in rat frontal cortex. **The Journal of Neuroscience**, v. 16, n. 8, p. 2701-2715, 1996.

Kilb, W., Kirischuk, S., & Luhmann, H. J. (2011). Role of tonic GABAergic currents during pre- and early postnatal rodent development. **Frontiers in Neural Circuits**, 5, 19. <https://doi.org/10.3389/fncir.2011.00019>

Korkmaz, O. T., Arkan, S., Öncü-Kaya, E. M., Ateş, N., & Tunçel, N. (2021). Vasoactive intestinal peptide (VIP) conducts the neuronal activity during absence seizures: GABA seems to be the main mediator of VIP. **Neuroscience letters**, 765, 136268. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2021.136268>

KRULEWITCH CJ. Alcohol consumption during pregnancy. **Annu Rev Nurs Res**. 2005; 23:101-34. PMID: 16350764.

LANDI S, PETRUCCO L, SICCA F, RATTO GM. Transient Cognitive Impairment in Epilepsy. **Front Mol Neurosci**. 2019 Jan 7;11:458. doi: 10.3389/fnmol.2018.00458. PMID: 30666185; PMCID: PMC6330286.

LARKUM, M. E. A cellular mechanism for cortical associations: an organizing principle for the cerebral cortex. **Trends in Neurosciences**, v. 36, n. 3, p. 141-151, 2013

Lebel, C., & Beaulieu, C. (2011). Longitudinal development of human brain wiring continues from childhood into adulthood. **Journal of Neuroscience**, 31(30), 10937-10947. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5302-10.2011>

Lebel, C., Rasmussen, C., Wyper, K., Walker, L., Andrew, G., & Beaulieu, C. (2011). Brain diffusion abnormalities in children with fetal alcohol spectrum disorder.

Lee SM, Yeh PWL, Yeh HH. L-Type Calcium Channels Contribute to Ethanol-Induced Aberrant Tangential Migration of Primordial Cortical GABAergic Interneurons in the Embryonic Medial Prefrontal Cortex. **eNeuro**. 2022 Jan 28;9(1):ENEURO.0359-21.2021. doi: 10.1523/ENEURO.0359-21.2021. PMID: 34930830; PMCID: PMC8805770.

LÉGER C, DUPRÉ N, LAQUERRIÈRE A, LECOINTRE M, DUMANOIR M, JANIN F, HAUCHECORNE M, FABRE M, JÉGOU S, FRÉBOURG T, CLEREN C, LEROUX P, MARCORELES P, BRASSE-LAGNEL C, MARGUET F, GONZALEZ BJ. In utero alcohol exposure exacerbates endothelial protease activity from pial microvessels and impairs GABA interneuron positioning. **Neurobiol Dis**. 2020 Nov;

Leitch B. (2024). Parvalbumin Interneuron Dysfunction in Neurological Disorders: Focus on Epilepsy and Alzheimer's Disease. **International journal of molecular sciences**, 25(10), 5549. <https://doi.org/10.3390/ijms25105549>

LEWIS, D. A. et al. Cortical parvalbumin interneurons and cognitive dysfunction in schizophrenia. **Trends in Neurosciences**, v. 35, n. 1, p. 57-67, 2012.

Licheri, V., Jacquez, B. J., Castillo, V. K., Sainz, D. B., Valenzuela, C. F., & Brigman, J. L. (2023). Long-term effects of low prenatal alcohol exposure on GABAergic interneurons of the murine posterior parietal cortex. **Alcohol, clinical & experimental research**, 47(12), 2248–2261. <https://doi.org/10.1111/acer.15210>

Lim, L., Mi, D., Llorca, A., & Marín, O. (2018). Development and functional diversification of cortical interneurons. **Neuron**, 100(2), 294-313.

Lodato, S., & Arlotta, P. (2015). Generating neuronal diversity in the mammalian cerebral cortex. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 31, 699-720.

LODATO, S.; ARLOTTA, P. Generating neuronal diversity in the mammalian cerebral cortex. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 31, p. 699-720, 2015.

LOVETT-BARRON, M. et al. Regulation of neuronal input transformations by tunable dendritic inhibition. **Nature Neuroscience**, v. 15, n. 3, p. 423-430, 2012.

Luhmann, H. J., Kirischuk, S., & Kilb, W. (2018). The superior function of the subplate in early neocortical development. **Frontiers in Neuroanatomy**, 12, 97. <https://doi.org/10.3389/fnana.2018.00097>

Lui, J. H., Hansen, D. V., & Kriegstein, A. R. (2011). Development and evolution of the human neocortex. **Cell**, 146(1), 18-36. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.06.030>

Lüttjohann A, Fabene PF, van Luijtelaar G. A revised Racine's scale for PTZ-induced seizures in rats. **Physiol Behav.** 2009 Dec 7;98(5):579-86. doi: 10.1016/j.physbeh.2009.09.005. Epub 2009 Sep 20. PMID: 19772866.

MAGLOIRE V, MERCIER MS, KULLMANN DM, PAVLOV I. GABAergic Interneurons in Seizures: Investigating Causality With Optogenetics. **Neuroscientist**. 2019

Aug;25(4):344-358. doi: 10.1177/1073858418805002. Epub 2018 Oct 15. PMID: 30317911; PMCID: PMC6745605.

Marín O. Interneuron dysfunction in psychiatric disorders. **Nat Rev Neurosci**. 2012 Jan 18;13(2):107-20. doi: 10.1038/nrn3155. PMID: 22251963.

Marín, O. (2012). Interneuron dysfunction in psychiatric disorders. **Nature Reviews Neuroscience**, 13(2), 107-120.

Marín, O. (2013). Cellular and molecular mechanisms controlling the migration of neocortical interneurons. **European Journal of Neuroscience**, 38(1), 2019-2029. <https://doi.org/10.1111/ejn.12225>

Marín, O. (2016). Developmental timing and critical windows for the treatment of psychiatric disorders. **Nature Medicine**, 22(11), 1229–1238.

MARÍN, O. Interneuron dysfunction in psychiatric disorders. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 13, n. 2, p. 107-120, 2012.

Mattson, S. N., Bernes, G. A., & Doyle, L. R. (2019). Fetal alcohol spectrum disorders: A review of the neurobehavioral deficits associated with prenatal alcohol exposure. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, 43(6), 1046-1062.

May, P. A., Chambers, C. D., Kalberg, W. O., Zellner, J., Feldman, H., Buckley, D., ... & Hoyme, H. E. (2018). Prevalence of fetal alcohol spectrum disorders among US children. **JAMA**, 319(5), 474-482. <https://doi.org/10.1001/jama.2017.21896>

Melissa Barber, William D Andrews, Fani Memi, Phillip Gardener, Daniel Ciantar, Mathew Tata, Christiana Ruhrberg, John G Parnavelas, Vegfa derivado vascular promove migração de interneurônios corticais e proximidade com a vasculatura no prosencéfalo em desenvolvimento, **Córtex Cerebral**, Volume 28, Edição 7, julho de 2018, Páginas 2577–2593, <https://doi.org/10.1093/cercor/bhy082>

Meyer HS, Schwarz D, Wimmer VC, Schmitt AC, Kerr JN, Sakmann B, Helmstaedter M. Inhibitory interneurons in a cortical column form hot zones of inhibition in layers 2 and 5A. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2011 Oct 4;108(40):16807-12. doi: 10.1073/pnas.1113648108. Epub 2011 Sep 26. PMID: 21949377; PMCID: PMC3189020.

Miller, M. W. (2016). Brain development: Normal processes and the effects of alcohol and nicotine. In **Handbook of Clinical Neurology** (Vol. 125, pp. 51–67). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63521-1.00004-7>

MILLER, M. W. **Brain development**: Normal processes and the effects of alcohol and nicotine. Oxford: Oxford University Press, 2016.

Molnár, Z., Luhmann, H. J., & Kanold, P. O. (2019). Transient cortical circuits match spontaneous and sensory-driven activity during development. **Science**, 363(6424), 1226–1230. <https://doi.org/10.1126/science.aaw4322>

Monteiro, Á. B., Alves, A. F., Ribeiro Portela, A. C., Oliveira Pires, H. F., Pessoa de Melo, M., Medeiros Vilar Barbosa, N. M., & Bezerra Felipe, C. F. (2024). Pentylentetrazole: A review. **Neurochemistry international**, 180, 105841. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2024.105841>

Moore, E. S., Ward, R. E., Jamison, P. L., Morris, C. A., & Bader, P. I. (2014). Fetal alcohol spectrum disorders: Morphological and imaging phenotypes. **American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics**, 166(4), 486–497.

Mosili, P., Maikoo, S., Mabandla, M. V., & Qulu, L. (2020). The Pathogenesis of Fever-Induced Febrile Seizures and Its Current State. **Neuroscience insights**, 15, 2633105520956973. <https://doi.org/10.1177/2633105520956973>

O'MALLEYK, BARR H (1998) Fetal Alcohol syndrome and convulsure disorder. **Can J Psychol** 43 : 1051

Oliveira, J. R. M., & Bertolla, R. P. (2016). *Microcefalia: da gênese genética à infecção pelo vírus Zika*. **Revista Neurociências**, 24(2), 77-82.

Olsen RW, Sieghart W. International Union of Pharmacology. LXX. Subtypes of gamma-aminobutyric acid(A) receptors: classification on the basis of subunit composition, pharmacology, and function. Update. **Pharmacol Rev**. 2008 Sep;60(3):243-60. doi: 10.1124/pr.108.00505. Epub 2008 Sep 12. PMID: 18790874; PMCID: PMC2847512.

Parrish, R. R., Codadu, N. K., Mackenzie-Gray Scott, C., & Trevelyan, A. J. (2019). Feedforward inhibition ahead of ictal wavefronts is provided by both parvalbumin- and somatostatin-expressing interneurons. *The Journal of physiology*, 597(8), 2297–2314. <https://doi.org/10.1113/JP277749>

PIACENTINI, S. et al. VIP interneurons selectively enhance weak but behaviorally-relevant stimuli. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, p. 1-14, 2021.

Rakic P. Mode of cell migration to the superficial layers of fetal monkey neocortex. **J Comp Neurol**. 1972 May;145(1):61-83. doi: 10.1002/cne.901450105. PMID: 4624784.

Rakic, P. (2007). The radial edifice of cortical architecture: From neuronal silhouettes to genetic engineering. **Brain Research Reviews**, 55(2), 204–219. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2007.02.010>

Reid HMO, Trepanier O, Gross A, Poberezhnyk P, Snowden T, Conway K, Breit KR, Rodriguez C, Thomas JD, Christie BR. Prenatal ethanol and cannabis exposure have sex- and region-specific effects on somatostatin and neuropeptide Y interneurons in the rat hippocampus. **Alcohol Clin Exp Res (Hoboken)**. 2024 Jul;48(7):1289-1301. doi: 10.1111/acer.15350. Epub 2024 May 24. PMID: 38789401; PMCID: PMC11236510.

Riley, E. P., Infante, M. A., & Warren, K. R. (2011). Fetal alcohol spectrum disorders: an overview. **Neuropsychology Review**, 21, 73–80. <https://doi.org/10.1007/s11065->

[011-9166-x](#)

Rivera, C., et al. (1999). The K⁺/Cl⁻ co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation. **Nature**, 397(6716), 251-255.

ROTH FC, DRAGUHN A. **GABA metabolism and transport: effects on synaptic efficacy**. Neural Plast. 2012;2012:805830. doi: 10.1155/2012/805830. Epub 2012 Feb 23. PMID: 22530158; PMCID: PMC3316990.

Roux C, Aligny C, Lesueur C, Girault V, Brunel V, Ramdani Y, Genty D, Driouich A, Laquerrière A, Marret S, Brasse-Lagnel C, Gonzalez BJ, Bekri S. NMDA receptor blockade in the developing cortex induces autophagy-mediated death of immature cortical GABAergic interneurons: An ex vivo and in vivo study in Gad67-GFP mice. **Exp Neurol**. 2015 May;267:177-93. doi: 10.1016/j.expneurol.2015.02.037. Epub 2015 Mar 17. PMID: 25795167.

RUDY, B. et al. Three groups of interneurons account for nearly 100% of neocortical GABAergic neurons. **Developmental Neurobiology**, v. 71, n. 1, p. 45-61, 2011.

Saito M, Subbanna S, Zhang X, Canals-Baker S, Smiley JF, Wilson DA, Das BC. Effects of retinoic acid receptor α modulators on developmental ethanol-induced neurodegeneration and neuroinflammation. **Front Neurosci**. 2023

Sambo, D., Kinstler, E., Lin, Y., & Goldman, D. (2024). Differential effects of prenatal alcohol exposure on brain growth reveals early upregulation of cell cycle and apoptosis and delayed downregulation of metabolism in affected offspring. **PloS one**, 19(11), e0311683. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0311683>

Schulz JM, Knoflach F, Hernandez MC, Bischofberger J. Dendrite-targeting interneurons control synaptic NMDA-receptor activation via nonlinear α 5-GABAA receptors. **Nat Commun**. 2018 Sep 3;9(1):3576. doi: 10.1038/s41467-018-06004-8. PMID: 30177704; PMCID: PMC6120902.

Shen Yiming, Fiáth Richárd, Ulbert István, Antoine Michelle W (2024) TRPV3 channel activity helps cortical neurons stay active during fever **eLife** 13:RP102412 <https://doi.org/10.7554/eLife.102412.1>

Silbereis, J. C., Pochareddy, S., Zhu, Y., Li, M., & Sestan, N. (2016). The cellular and molecular landscapes of the developing human central nervous system. *Neuron*, **89**(2), 248–268. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.12.008>

Silva, C. G., Peyre, E., & Nguyen, L. (2019). Cell migration promotes dynamic cellular interactions to control cerebral cortex morphogenesis. **Nature Reviews Neuroscience**, *20*(6), 318–329. <https://doi.org/10.1038/s41583-019-0143-2>

Siqueira M, Araujo APB, Gomes FCA, Stipursky J. Ethanol Gestational Exposure Impairs Vascular Development and Endothelial Potential to Control BBB-Associated Astrocyte Function in the Developing Cerebral Cortex. **Mol Neurobiol.** 2021 Apr;58(4):1755-1768. doi: 10.1007/s12035-020-02214-8. Epub 2021 Jan 2. PMID: 33387302.

SOHAL, V. S. et al. Parvalbumin neurons and gamma rhythms enhance cortical circuit performance. **Nature**, v. 459, n. 7247, p. 698-702, 2009.

Sohal, V. S., & Rubenstein, J. L. R. (2019). Excitation-inhibition balance as a framework for investigating mechanisms in neuropsychiatric disorders. **Molecular Psychiatry**, *24*(9), 1248–1257.

SOHAL, V. S.; RUBENSTEIN, J. L. Excitation-inhibition balance as a framework for investigating mechanisms in neuropsychiatric disorders. **Molecular Psychiatry**, v. 24, p. 1248-1257, 2019.

Sowell, E. R., et al. (2008). Mapping white matter integrity and neurobehavioral correlates in children with fetal alcohol spectrum disorders. **The Journal of Neuroscience**, *28*(6), 1313–1319. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5067-07.2008>

Stiles, J., & Jernigan, T. L. (2010). The basics of brain development. **Neuropsychology Review**, 20, 327–348. <https://doi.org/10.1007/s11065-010-9148-4>

Szyndler J, Maciejak P, Kołosowska K, Chmielewska N, Skórzewska A, Daszczuk P, Płażnik A. Altered expression of GABA-A receptor subunits in the hippocampus of PTZ-kindled rats. **Pharmacol Rep.** 2018 Feb;70(1):14-21. doi: 10.1016/j.pharep.2017.07.008. Epub 2017 Jul 16. PMID: 29306758.

Takesian, A. E., & Hensch, T. K. (2013). Balancing plasticity/stability across brain development. *Progress in Brain Research*, 207, 3-34. Wonders, C. P., & Anderson, S. A. (2006). The origin and specification of cortical interneurons. **Nature Reviews Neuroscience**, 7(9), 687-696

Tan X, Liu WA, Zhang XJ, Shi W, Ren SQ, Li Z, Brown KN, Shi SH. Vascular Influence on Ventral Telencephalic Progenitors and Neocortical Interneuron Production. **Dev Cell.** 2016 Mar 21;36(6):624-38. doi: 10.1016/j.devcel.2016.02.023. PMID: 27003936; PMCID: PMC4806403.

THACKRAY H, TIFFT C. Fetal alcohol syndrome. **Pediatr Rev.** 2001 Feb;22(2):47-55. doi: 10.1542/pir.22-2-47. PMID: 11157101

Treiman DM. GABAergic mechanisms in epilepsy. **Epilepsia.** 2001;42 Suppl 3:8-12. doi: 10.1046/j.1528-1157.2001.042suppl.3008.x. PMID: 11520315.

Treit, S., Zhou, D., Chudley, A. E., Andrew, G., Rasmussen, C., Nikkel, S. M., Samdup, D., Hanlon-Dearman, A., Looock, C., & Beaulieu, C. (2016). Relationships between Head Circumference, Brain Volume and Cognition in Children with Prenatal Alcohol Exposure. **PloS one**, 11(2), e0150370. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150370>

Tremblay R, Lee S, Rudy B. GABAergic Interneurons in the Neocortex: From Cellular Properties to Circuits. **Neuron.** 2016 Jul 20;91(2):260-92. doi: 10.1016/j.neuron.2016.06.033. PMID: 27477017; PMCID: PMC4980915.

TREMBLAY, R.; LEE, S.; RUDY, B. GABAergic interneurons in the neocortex: from cellular properties to circuits. **Neuron**, v. 91, n. 2, p. 260-292, 2016.

TURRIGIANO, G. Homeostatic synaptic plasticity: local and global mechanisms for stabilizing neuronal function. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 4, n. 1, a005736, 2012.

URBAN-CIECKO, J.; BARTH, A. L. Somatostatin-expressing neurons in cortical networks. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 17, n. 7, p. 401-409, 2016.

Valenzuela, C. F., Puglia, M. P., & Zucca, S. (2012). Focus on: Neurotransmitter systems. **Alcohol Research: Current Reviews**, 34(2), 157–169.

Van Erum J, Van Dam D, De Deyn PP. PTZ-induced seizures in mice require a revised Racine scale. **Epilepsy Behav**. 2019 Jun;95:51-55. doi: 10.1016/j.yebeh.2019.02.029. Epub 2019 Apr 24. PMID: 31026782.

WANG, Y. et al. Anatomical, physiological and molecular properties of Martinotti cells in the somatosensory cortex of the juvenile rat. **Journal of Physiology**, v. 561, n. 1, p. 65-90, 2004.

Won C, Lin Z, Kumar T P, Li S, Ding L, Elkhail A, Szabó G, Vasudevan A. Autonomous vascular networks synchronize GABA neuron migration in the embryonic forebrain. **Nat Commun**. 2013;4:2149. doi: 10.1038/ncomms3149. PMID: 23857367; PMCID: PMC3763945.

Yokota Y, Gashghaei HT, Han C, Watson H, Campbell KJ, Anton ES. Radial glial dependent and independent dynamics of interneuronal migration in the developing **cerebral cortex**. **PLoS One**. 2007 Aug 29;2(8):e794. doi: 10.1371/journal.pone.0000794. PMID: 17726524; PMCID: PMC1950908.

Zhong S, Zhao Z, Xie W, Cai Y, Zhang Y, Ding J, Wang X. GABAergic Interneuron and Neurotransmission Are mTOR-Dependently Disturbed in Experimental Focal Cortical

Dysplasia. Mol Neurobiol. 2021 Jan;58(1):156-169. doi: 10.1007/s12035-020-02086-y. Epub 2020 Sep 10. PMID: 32909150.