



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA CELULAR

DINAIR PAMPLONA DOS SANTOS TEMBRA

**EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE PARÂMETROS COGNITIVOS E  
BIOQUÍMICOS EM RATOS EXPOSTOS AO ETANOL DE FORMA INTENSA E  
EPISÓDICA (*BINGE DRINKING*)**

BELEM

2018

DINAIR PAMPLONA DOS SANTOS TEMBRA

**EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE PARÂMETROS COGNITIVOS E  
BIOQUÍMICOS EM RATOS EXPOSTOS AO ETANOL DE FORMA INTENSA E  
EPISÓDICA (*BINGE DRINKING*)**

Tese de doutorado submetida à coordenação do Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular do Instituto de ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará – UFPA como requisito parcial para obtenção do título de doutora em Neurociências e Biologia Celular – área de concentração em Neurociências.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Rodrigues Lima

BELÉM

2018

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD**  
**Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará**  
**Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

---

- P185e Pamplona dos Santos Tembra, Dinair.  
Efeitos do Exercício físico sobre parâmetros cognitivos e bioquímicos em ratos expostos ao etanol de forma intensa e episódica (Binge drinking) / Dinair Pamplona dos Santos Tembra. — 2018.  
89 f. : il. color.
- Orientador(a): Prof. Dr. Rafael Rodrigues Lima  
Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2018.
1. Alcool, beber em excesso, exercício físico, cognição, estresse oxidativo. I. Título.

DINAIR PAMPLONA DOS SANTOS TEMBRA

**EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE PARÂMETROS COGNITIVOS E  
BIOQUÍMICOS EM RATOS EXPOSTOS AO ETANOL DE FORMA INTENSA E  
EPISÓDICA (*BINGE DRINKING*)**

Tese de doutorado submetida à coordenação do Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular do Instituto de ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará – UFPA como requisito parcial para obtenção do título de doutora em Neurociências e Biologia Celular – área de concentração em Neurociências.

Data:

**Banca examinadora:**

---

Prof. Dr. Rafael Rodrigues Lima - Orientador  
Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará

---

Profa. Dra. Luanna, de Melo Pereira Fernandes  
Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Pará

---

Profa. Dra. Renata Duarte de Souza Rodrigues  
Instituto de Ciências da Arte, Universidade Federal do Pará

---

Profa. Dra. Lucília Fonseca Santiago  
Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará

## DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos meus pais João e Marieta (*in  
memoriam*)

## AGRADECIMENTOS

A Deus! Para Ele toda honra e toda glória sempre! Responsável por tudo de bom que tenho e que sou na vida;

Aos meus pais (falecidos) João e Marieta, pelo exemplo de honestidade, amor, carinho e especialmente pelo incentivo a minha caminhada e busca profissional;

Aos meus filhos Aroldo, André e Alexandre, por me aturarem em vários momentos de estresse e por serem os grandes amores de minha vida. Especialmente ao “cururuzinho” pela amizade e apoio emocional;

As minhas netas (tesouros) Luna e Laura que são, atualmente, responsáveis pela motivação em busca de melhorias;

As minhas irmãs e irmãos, em especial Deise, pelos quatro anos de apoio em todas as formas;

Ao Prof. Dr. Rafael Rodrigues Lima, meu orientador, pela realização dessa pesquisa, pelo acolhimento em seu laboratório e pelo imenso apoio científico e amizade;

A minha amiga e colega Kátia, pelo suporte emocional e pela caminhada nesse projeto;

A todos os integrantes do Laboratório de Biologia Experimental e Funcional (LABEF), em especial ao Leonardo Bittencourt e Rafael Fernandes pela ajuda e suporte técnico;

A todos os integrantes do Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Comportamento (Lafico), em especial, à Profa. Dra. Cristiane Maia, pelo acolhimento e viabilização dos testes comportamentais. Assim como os apoios fundamentais de Luanna Fernandes, Sabrina de Carvalho e Pablo Henrique Franco;

À Profa. Dra. Marta Chagas e Sávio pelo apoio na execução dos ensaios de estresse oxidativo;

Ao Biotério Central da Universidade Federal do Pará, por fornecer os animais utilizados nesta pesquisa, especialmente ao Reginaldo e Amarildo e todos os meninos do biotério, pela grande ajuda na viabilização das amostras;

Ao programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular pela oportunidade de realizar este estudo. Especial agradecimento à Socorro pelo suporte e viabilização dos trâmites inerentes ao programa;

À Universidade Federal do Pará que me acolhe desde a minha graduação, profissionalização e agora pós-graduação;

Ao CNPQ pelo auxílio financeiro para execução deste trabalho.

*“Concedei-me Senhor, a serenidade  
necessária para aceitar as coisas que  
não posso modificar. Coragem para  
modificar as que posso, e sabedoria  
para distinguir umas das outras”*

(Alcoólicos Anônimos – AA)

## RESUMO

O padrão de consumo de etanol pesado e episódico, consumo de fim de semana, caracteriza o padrão de consumo excessivo de álcool ou *binge drinking* que promove um desequilíbrio das funções metabólicas encefálicas, contribuindo para a neurodegeneração e disfunção cerebral. E por ser uma droga legal, tem relevância global em saúde pública e social. Desta forma, objetivamos investigar os efeitos do treinamento físico de intensidade moderada, em esteira rolante, sobre os efeitos deletérios do etanol nas funções do hipocampo relacionadas à memória e aprendizagem. Para isso, foram utilizados 80 ratos Wistar, divididos em quatro grupos: Grupo controle; Grupo treinado (animais treinados e tratados com água destilada); Grupo etanol (animais não treinados e tratados com doses de 3 g / kg / dia de etanol, 20% p/v); e grupo etanol + treinado (animais treinados e expostos ao etanol). O exercício físico foi realizado em esteira rolante por 5 dias por semana durante 4 semanas e todas as doses de etanol e água destilada foram administradas por gavagem intragástrica (três dias por semana) em quatro ciclos repetidos. Após o período experimental, os animais foram submetidos à tarefa de reconhecimento de objetos e teste do labirinto aquático de Morris, e após eutanasiados, o sangue e o hipocampo foram coletados para medição de níveis da capacidade antioxidante equivalente ao trolox (TEAC), conteúdo de glutathiona reduzida (GSH), nitrito e peroxidação lipídica (LPO). Nossos resultados mostraram que o etanol causou acentuado estresse oxidativo e dano mnemônico, e o exercício físico promoveu efeitos neuroprotetores, entre eles, a modulação da bioquímica oxidativa no plasma (pela restauração dos níveis de GSH) e no hipocampo (reduzindo os níveis de LPO e aumentando os parâmetros antioxidantes) e melhoria da função cognitiva. Portanto, o exercício físico pode ser uma ferramenta profilática e terapêutica importante para melhorar e até prevenir os efeitos deletérios do etanol nas funções cognitivas.

Palavras-chave: Álcool, beber em excesso, exercício físico, cognição, estresse oxidativo, ratos, glutathiona.



## **ABSTRACT**

The consumption pattern of heavy and episodic ethanol, weekend consumption, characterizes the pattern of excessive alcohol consumption or binge drinking that promotes an imbalance of brain metabolic functions, contributing to neurodegeneration and cerebral dysfunction. And because it is a legal drug, it has global relevance in public and social health. In this way, we aimed to investigate the effects of physical training of moderate intensity, in treadmill, on the deleterious effects of ethanol on hippocampus functions related to memory and learning. For this, 80 Wistar rats were divided into four groups: Control group; Trained group (animals trained and treated with distilled water); Ethanol group (animals not trained and treated with doses of 3 g / kg / day of ethanol, 20% w / v); and ethanol + trained group (animals trained and exposed to ethanol). Physical exercise was performed on a treadmill for 5 days a week for 4 weeks and all doses of ethanol and distilled water were administered by intragastric gavage (three days a week) in four repeated cycles. After the experimental period, the animals were submitted to the task of object recognition and Morris aquatic labyrinth test, and after euthanasia, blood and hippocampus were collected to measure levels of antioxidant capacity equivalent to trolox (TEAC), content of reduced glutathione (GSH), nitrite and lipid peroxidation. (LPO). Our results showed that EtOH caused marked oxidative stress and mnemonic damage, and physical exercise promoted neuroprotective effects, including modulation of oxidative plasma biochemistry (by restoration of GSH levels) and hippocampus (reducing levels of LPO and increasing antioxidant parameters) and improving cognitive function. Therefore, physical exercise may be an important prophylactic and therapeutic tool to improve and even prevent the deleterious effects of ethanol on cognitive functions.

**Keywords:** Alcohol, binge drinking, physical exercise, cognition, oxidative stress, rats, glutathione.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> - Resumo do metabolismo do EtOH.....	22
<b>Figura 2</b> - Hipocampo e áreas e vias relacionadas ao processo mnemônico.....	32
<b>Figura 3</b> - Cronograma experimental do protocolo de treinamento físico em esteira e administração de etanol (EtOH) ou água destilada (H <sub>2</sub> O <sub>d</sub> ) por gavagem.....	53
<b>Figura 4</b> - Ilustração do teste de reconhecimento de objeto.....	55
<b>Figura 5</b> - Ilustração do teste do labirinto aquático de Morris.....	56
<b>Figura 6</b> - Delineamento experimental e resumo da metodologia empregada no estudo.....	59
<b>Figura 7</b> - Gráfico do peso dos grupos experimentais.....	61
<b>Figura 8</b> - Gráfico da bioquímica oxidativa sanguínea.....	62
<b>Figura 9</b> - Gráfico da bioquímica oxidativa hipocampal.....	63
<b>Figura 10</b> - Gráfico representando os resultados do teste de reconhecimento de objeto.....	64
<b>Figura 11</b> - Gráfico representativo da avaliação dos resultados no teste em labirinto aquático de <i>Morris</i> .....	65

## **LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1.</b> Apresentação da alcoolemia e seus efeitos no organismo humano.....	22
---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**NO** – Óxido nítrico

**O<sub>2</sub><sup>·-</sup>** – Ânion superóxido

**OH<sup>·</sup>** – Radical hidroxila

**ONOO<sup>·</sup>** – Peróxido nitrito

**ABEAD** – Associação Brasileira de Estudos do Álcool e outras Drogas

**ADH** – Álcool desidrogenase

**ALDH** – Aldeído desidrogenase

**AMPA** – Ácido  $\alpha$ -amino-3-hidróxi-5-metil-4-isoxazol propiônico

**APA** – *American Psychiatric Association*

**AUD** – Transtornos relacionados ao uso do álcool

**BD** – *Binge drinking*

**BDNF** – *Brain-derived neurotrophic factor*

**BPE** – Beber pesado episódico

**CA** – Corno de Ammon

**Ca<sup>2+</sup>** – Íon cálcio

**CAT** – Catalase

**CISA** – Centro de Informações Sobre Saúde e Álcool

**COX-2** - Ciclooxigenase-2

**CPF** – Córtex préfrontal

**DALY** - *Disability adjusted life years*

**DPN** – Dia pós-natal

**ERN** – Espécies Reativas de Nitrogênio

**EROS** – Espécies Reativas de Oxigênio

**EtOH** – Etanol

**FASD** – Transtornos de Espectro Alcoólico Fetal

**GABA** – Ácido gama-aminobutírico

**GD** – Giro Denteado

**GLU** – Glutamato

**GPX** – Glutathione Peroxidase

**GSH** – Glutathione Reduzida

**GSSG** – Glutathione Oxidada

**iGluR** - Receptor Ionotrópico de Glutamato

**K<sup>+</sup>** – Íon potássio

**KA** – Ácido Caínico ou Cainato

**LENAD** – Levantamento Nacional de Álcool e Drogas

**LPO** – Lipoperoxidação

**LTP** – Potenciação de longa duração

**MCD** – Memória de curta duração

**MDA** – Malondialdeído

**mGluR** – Receptores de glutamato metabotrópicos

**MLP** – Memória de longa duração

**NIAAA** – National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism (USA)

**NMDA** – N-metil-D-aspartato

**OMS** – Organização Mundial da Saúde

**OPAS** – Organização Pan Americana de Saúde

**PEPS** – Potencial excitatório pós-sináptico

**SNC** – Sistema Nervoso Central

**SOD** – Superóxido dismutase

**TBA** – Ácido tiobarbitúrico

**TBARs** – Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

**TEAC** - Capacidade antioxidante total relativa ao trolox

**UA** - Unidades Alcoólicas

**WHOSIS** - *World Health Statistics*

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>17</b>
1.1	<b>O Abuso de Álcool e o Consumo em Binge</b>	<b>17</b>
1.1.1	Epidemiologia	17
1.1.2	Padrões de Consumo	20
1.1.3	Metabolismo	22
1.2	<b>Efeitos do Etanol no Sistema Nervoso Central</b>	<b>24</b>
1.2.1	Alterações Morfofuncionais do Cérebro na Infância e Adolescência	25
1.2.2	Efeitos do Etanol no Cérebro em Desenvolvimento	27
1.3	<b>Aspectos Morfofuncionais da Memória e Aprendizagem</b>	<b>29</b>
1.3.1	Localização e Tipos de Memórias	30
1.3.2	Fisiologia da Memória	33
1.3.3	Modulação da Memória pelo Etanol	37
1.4	<b>Estresse Oxidativo</b>	<b>40</b>
1.5	<b>Exercício Físico e o Sistema Nervoso</b>	<b>42</b>
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b>	<b>47</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>49</b>
3.1	Objetivo Geral	49
3.2	Objetivos Específicos	49
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA</b>	<b>51</b>
4.1	Animais Experimentais	51
4.2	Grupos experimentais	51
4.3	Tratamento com Etanol	51
4.4	Treinamento Físico	52
4.5	Testes comportamentais	53
4.5.1	Reconhecimento de Objeto	54
4.5.2	Labirinto Aquático de <i>Morris</i>	55
4.6	<b>Ensaio de Avaliação do Balanço Oxidativo Sanguíneo e Tecidual</b>	<b>56</b>
4.6.1	Capacidade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC)	57
4.6.2	Glutationa peroxidase (GPX) e glutationa redutase (GR)	57

4.6.3	Determinação do malondialdeído (MDA).....	58
4.6.4	Ensaio da concentração de nitrito (NO) .....	58
4.6.5	Concentração de Proteína .....	58
4.6.6	Determinação da peroxidação lipídica (LPO) .....	59
<b>4.7</b>	<b>Análise Estatística .....</b>	<b>59</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>61</b>
<b>5.1</b>	<b>Efeitos de ciclos repetidos de EtOH em padrão binge e treinamento físico em esteira no ganho de peso dos animais.....</b>	<b>61</b>
<b>5.2</b>	<b>O treinamento físico evitou alterações bioquímicas induzidas pela exposição ao EtOH em padrão binge por 4 semanas no plasma de ratos. ....</b>	<b>61</b>
<b>5.3</b>	<b>Treinamento físico regular em esteira modulou o equilíbrio bioquímico oxidativo no hipocampo de ratos expostos a quatro ciclos de consumo excessivo de álcool.....</b>	<b>62</b>
<b>5.4</b>	<b>O treinamento físico minimizou os déficits de memória de ratos expostos a ciclos repetidos de EtOH em padrão binge. ....</b>	<b>64</b>
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>67</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>73</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>75</b>

# I INTRODUÇÃO



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 O Abuso de Álcool e o Consumo em Binge

O álcool etílico ou etanol (EtOH) entre todas as drogas psicoativas é a que tem maior número de usuários no mundo. É uma das poucas drogas psicotrópicas que tem seu consumo admitido e incentivado pela sociedade. Talvez seja a mais antiga utilizada pela espécie humana, havendo vestígios da sua existência desde períodos paleolíticos (BOUTROS et al., 2014; WESTERMEYER, 1991). No Egito e na Assíria, festas de veneração aos deuses da agricultura culminavam em bebedeiras coletivas que duravam dias seguidos. Conforme os egípcios, o deus Osíris teria ensinado os homens a cultivar a videira e a cevada para a fabricação de bebidas capazes de “inspirar a alma” (CISA, 2018).

A bebida passa a ser chamada de alcoólica quando o EtOH está presente em concentração igual ou superior a 1% do seu volume. Conforme sua fabricação, a bebida alcoólica pode ser fermentada e destilada. As fermentadas são obtidas de frutas ou cereais que quando submetidas à ação de leveduras convertem-se em álcool. O vinho e a cerveja são as duas bebidas fermentadas mais consumidas mundialmente. As destiladas são obtidas através da eliminação por intermédio de calor de uma parte de água contida nas bebidas fermentadas, temos como exemplo o uísque e a vodka (CISA, 2018).

O uso indiscriminado do álcool, por seu fácil acesso e comercialização legal, acarreta consequências físicas e sociais que segundo levantamentos epidemiológicos constitui um problema de saúde pública mundial, necessitando de políticas públicas na tentativa de minimizar ou prevenir suas consequências (OMS, 2018).

### 1.1.1 Epidemiologia

Quando consumido de maneira abusiva, o EtOH está associado a sérias consequências para a saúde da população, pois é um dos principais fatores de risco para o desencadeamento de doenças cardiovasculares, ocorrência de acidentes de trânsito e homicídios, os quais representam a maior causa de morte entre jovens (LARANJEIRA, 2013; MODELLI, 2008, OMS, 2002).

Dados atualizados sobre a epidemiologia e as consequências do consumo de álcool foram divulgados em setembro de 2018 pela Organização Mundial da Saúde (OMS), através do relatório global sobre álcool e saúde. O uso nocivo do álcool está relacionado a três milhões de mortes em 2016 – o equivalente a quase 5,3% de todas as mortes no mundo. Constitui um

dos fatores de risco de maior impacto para a morbidade, mortalidade e incapacidades em todo o mundo. A OMS ainda destaca que apesar da diminuição no nível global de mortes e morbidade atribuíveis ao álcool (13,0% e 10,6%, respectivamente); o ônus global de doenças atribuíveis ao álcool ainda é muito significativo.

Segundo a OMS (2018), 40% dos indivíduos com quinze (15) anos ou mais, são bebedores atuais. A média de consumo *per capita* mundial foi de 6,4 L de álcool puro. No Brasil, cerca de 21,4% da população nunca ingeriu bebidas alcoólicas e aproximadamente 40% consumiram nos últimos 12 meses. O consumo estimado em 2016 foi de 7,8 L de álcool puro *per capita*. Esses dados sugerem uma redução no consumo de álcool pela população brasileira em relação à 2010 (8,8l de álcool puro *per capita*). Estima-se que homens consumam 13,4 L por ano, e as mulheres, 2,4 L. Vale destacar que o consumo está abaixo da média da região das Américas (8l de álcool puro *per capita*); porém maior do que a média mundial de 6,4 L.

Em torno de 5,1% da carga global de doenças foi atribuível ao consumo do álcool, o que equivale a 139 milhões de anos de vida ajustados por incapacidade (disability adjusted life years – DALY). A maior parte das lesões e acidentes fatais decorrentes do uso do álcool ocorre em grupos etários relativamente jovens. Na faixa etária de 20 a 39 anos, aproximadamente 25% de todas as mortes são atribuíveis ao álcool (OMS, 2015).

O II Levantamento de Álcool e Drogas (LENAD) mostra que apesar de a taxa de abstinência permanecer a mesma nos últimos anos (48% em 2006 e 52% em 2012), houve um aumento de 20% na proporção de bebedores frequentes (bebem uma ou mais vezes na semana), que foi de 45% em 2006 para 54% em 2012. O destaque mais significativo verificado pelo II LENAD foi o aumento de mulheres bebedoras frequentes, que passou de 29% em 2006 para 39% em 2012 (LARANJEIRA, 2013).

O II Levantamento Domiciliar sobre o Uso de Psicotrópicos no Brasil, evidenciou que 68,7% da população consome álcool na vida sendo, a região de maior consumo a sudeste com 80,4%; e a de menor consumo a região norte, com 53,9%. Segundo o mesmo levantamento, a faixa etária de maior preocupação seria de doze a dezessete anos e os homens apresentaram vidência de uso 11,4% e as mulheres apresentaram 8,9% (GALDURÓZ & CARLINI, 2002).

Sabe-se que dezoito em cada cem brasileiros são dependentes de bebida alcoólica. Pesquisas mostram que o hábito de beber entre crianças e adolescentes vem aumentando assustadoramente. O uso precoce do álcool, como vem ocorrendo entre adolescentes, média de treze anos de idade (WHOSIS, 2010), antecipa os riscos graves à saúde podendo promover

hepatite alcoólica, gastrite, síndrome de má absorção, hipertensão arterial, acidentes vasculares, cardiopatias, diferentes tipos de câncer, polineurite alcoólica (dor, formigamento e câibras nos membros inferiores) e pancreatite (CORDEIRO, 2012).

A ingestão de bebida alcoólica, mesmo em pequena quantidade, compromete a capacidade de dirigir veículos. É importante frisar que 75% dos acidentes fatais de trânsito, muitos deles com mortes (aproximadamente 29 mil/ano), e sequelas de deficiências múltiplas têm como causa o álcool, conforme os dados da Associação Brasileira de Estudos do Álcool e Outras Drogas (ABEAD) (OMS, 2008). Gasta-se cerca de R\$ 310 milhões relativos a internações decorrentes do uso abusivo e da dependência do álcool, conforme dados do Ministério da Saúde (LARANJEIRA, 2013).

O consumo nocivo do álcool está relacionado com mais de 200 tipos de doenças e lesões. Câncer, cirrose, desordens mentais e comportamentais, etilismo crônico (doença psiquiátrica crônica e progressiva - dependência), são frequentemente associadas ao uso do álcool. No entanto, uma proporção importante da carga de doença atribuível ao álcool é decorrente de lesões não intencionais e intencionais, incluindo-se aquelas devidas a acidentes de trânsito, violências e suicídios. Recentemente, o álcool também tem sido implicado na causalidade de doenças transmissíveis, como tuberculose e HIV/AIDS. A maior parte das lesões fatais decorrentes do uso do álcool ocorre em grupos etários relativamente jovens. Na faixa etária de vinte a trinta e nove anos, aproximadamente 25% de todas as mortes são atribuíveis ao álcool. (LARANJEIRA, 2013; PETIT et al., 2013)

Resultados da Pesquisa Nacional de Saúde em 2013, sobre o consumo abusivo de álcool no Brasil segundo características sócio-demográficas e de saúde apontam que os homens bebem mais que as mulheres, adultos jovens nas idades entre dezoito e vinte e nove anos, de cor da pele negra, fumantes ocasionais, de saúde boa ou muito boa e sem morbidades referidas. Assim, a prevalência do consumo abusivo de álcool apresenta diferenças segundo características sócio-demográficas e de saúde (GARCIA, 2015).

Todas as consequências nocivas do consumo de bebidas alcoólicas estão relacionadas à maneira de beber dos usuários. Evidências científicas vêm demonstrando a importância do conhecimento do padrão de consumo do álcool que, associado ao volume alcoólico total consumido, tem sido importante fator indicativo de problemas de saúde (REHM et al, 2006).

### 1.1.2 Padrões de Consumo

Os padrões de consumo de bebidas alcoólicas são identificados através da obtenção de informações sobre a frequência e a quantidade de ingestão de álcool. De acordo com esse critério, identificam-se os bebedores em padrão de consumo moderado (ou de baixo risco), o *binge drinking* (BD) ou beber pesado episódico (BEP), o uso nocivo/abuso e a dependência alcoólica. A ingestão pode ser contínua ou intermitente, de forma aguda ou crônica (GUNZERATH et al, 2004; LARANJEIRA et al, 2007; OMS, 2014).

O consumo moderado de álcool é o padrão em que a ingestão alcoólica, por si só, não acarreta malefícios à saúde do indivíduo, portanto, é considerado de baixo risco (GUNZERATH et al, 2004). Em termos de unidades de bebida, corresponde ao consumo de até quatorze unidades alcoólicas (UA) semanalmente para homens e sete para mulheres, tendo como unidade-padrão alcoólica a taxa de 14g de EtOH puro. Para um consumo diário, traduz um limite de duas UA (28g) para homens e apenas uma (14g) para mulheres. Nessa quantidade, o uso moderado é incapaz de causar problemas individuais ao bebedor, nem problemas à sociedade (OMS, 2002).

Segundo a OMS, o padrão de consumo nocivo, também chamado de problemático, é aquele no qual o indivíduo acumula algum prejuízo em qualquer âmbito de sua vida e pode estar associado à doença física e mental. Para KERR-CORRÊA (2005), o padrão de consumo nocivo o qual com maior frequência torna o indivíduo dependente químico, é aquele caracterizado pela presença de sinais como tolerância ao consumo de álcool, abstinência e sensação de perda do controle sobre o modo de beber. Entretanto, vale ressaltar que qualquer categoria está sempre associada à avaliação das chances de o usuário desenvolver doenças crônicas secundárias ao se expor por longos períodos a uma determinada quantidade por dia (OPAS, 2006).

O “*binge drinking*” é definido como o padrão de uso que pode implicar em alta probabilidade de danos físicos ou mentais mais tardios, porém não relacionado a problemas médicos ou psiquiátricos em uma fase mais precoce (OMS, 2015). É padrão de consumo desregrado durante dois ou três dias, ou mesmo em um final de semana. Alguns pesquisadores definiram como o consumo de mais de sessenta (60) gramas de álcool etílico para homens ou de cinquenta (50) gramas ou mais para mulheres em um mesmo momento. Não existe um consenso mundial sobre o nível de consumo alcoólico que caracteriza este padrão de uso. A OMS estabeleceu como critério para classificar como bebedor *binge drinking*, o indivíduo que consome um volume alcoólico excessivo em um curto espaço de tempo. Binge é ainda

caracterizado por episódios repetidos de consumo excessivo de álcool levando à intoxicação seguida pela abstinência (OMS, 2014).

Em 2005, o *National Institute of Alcohol Abuse and Alcoholism* - EUA (NIAAA) definiu “*binge drinking*” como o padrão de beber que provoca uma concentração alcoólica sanguínea (BAC - *blood alcohol concentration*) igual ou acima de 0.8 g/L. Isso significa, em um adulto típico, um consumo de setenta (70) gramas de EtOH ou mais para homens ou de cinquenta e seis (56) gramas ou mais para mulheres em um período de duas horas. Essa dosagem é equivalente a cinco e quatro doses no mínimo para homens e mulheres, respectivamente. Essa diferença de 5/4 entre homens e mulheres se deve a menor taxa de metabolismo gástrico do álcool nas mulheres, elevando com isso os níveis de álcool no sangue, quando comparado com os homens para a mesma quantidade (KEER-CORRÊA, 2008). A definição 5/4 é consistente com os resultados que após o consumo desta quantidade ou acima, os indivíduos tornam-se vulneráveis a problemas graves relacionados com o álcool (vandalismo, brigas, ferimentos, acidentes, problemas com a polícia, etc.) e subsequentes consequências negativas em relação à saúde e problemas sociais, econômicos ou legais (LARANJEIRA, 2007).

O termo beber pesado episódico (BPE) tem sido utilizado como um substituto para o *binge drinking*. Caracterizado pelo consumo de pelo menos 60g de EtOH em uma única ocasião, o BPE não qualificaria o bebedor para o diagnóstico de uso nocivo do álcool. Porém, implicitamente promoveria uma situação de exposição do indivíduo a uma série de prejuízos álcool-induzidos (ANTONY, 1998). Beber 60g de EtOH em uma única ocasião, bem como acima desse valor, pode promover intoxicação alcoólica, a qual com certa frequência gera importantes modificações neurofisiológicas, como desinibição comportamental, comprometimento cognitivo, déficit de atenção, falta de discernimento e de julgamento e diminuição da coordenação motora (LARANJEIRA et al, 2007).

Esse padrão de consumo também aumentou de 45% em 2006 para 59% em 2012 entre os bebedores, e entre as mulheres de 36% em 2006 para 49% em 2012 (II LENAD, 2013). É importante ressaltar que essa entrevista foi realizada com indivíduos a partir dos 14 anos de idade em diante.

Entender o padrão de consumo de álcool é um fator crucial ao se analisar as interferências que este causa na saúde dos indivíduos. Os que bebem apenas em ocasiões sociais (aniversários, casamentos, formaturas e etc) são menos susceptíveis às alterações alcoólicas do que aqueles onde o ato de beber se mostra uma prática constante e abusiva (LARANJEIRA, 2007). Na tabela 1 retratamos os efeitos do etanol no organismo, desde de uma alcoolemia de

0,1g de etanol por litro de sangue, ressaltando o intervalo de 0,6g a 1g, onde se configura o padrão binge.

ALCOOLEMIA (g/L)	EFEITOS NO ORGANISMO
0,1 – 0,5	Mudança sutil no estado de animosidade
0,6 – 1,0	Raciocínio em declínio. Menor capacidade de processar informações e perda de controle sobre comportamento
1,0 – 1,5	Comprometimento motor com andar “cambaleante”
1,6 - 2,9	Alto risco de blackouts (amnésia) e acidentes
3,0 – 3,9	Perda da consciência, paralisia e risco de morte
> 4,0	Dose letal

Tabela 1. Apresentação da alcoolemia e seus efeitos no organismo humano. Adaptada de CISA (2018) e OMS (2007).

### 1.1.3 Metabolismo

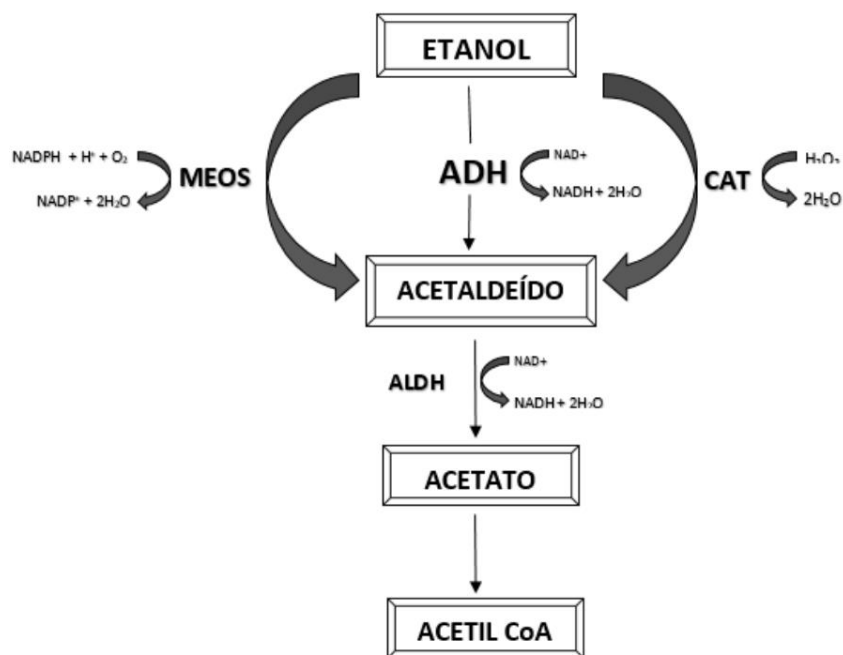
Independente dos padrões de consumo do álcool abordados anteriormente, as diferenças individuais do seu metabolismo podem colocar algumas pessoas em maior risco de desenvolver problemas relacionados ao álcool que outras. O corpo pode metabolizar apenas certa quantidade de álcool a cada hora. Esse montante varia amplamente entre os indivíduos e depende de uma série de fatores, incluindo o tamanho do fígado e massa corporal (CISA, 2018).

A absorção do álcool se faz por difusão simples no estômago (20%) e intestino delgado (80%), e somente 2 a 10% do seu conteúdo é absorvido, sendo a maior parte (80-90%) oxidada principalmente no fígado (ZAKHARI, 2006). A diluição, o esvaziamento gástrico, presença de alimentos sólidos e água são fatores que interferem na absorção do álcool. A taxa de absorção do álcool é menos rápida quando a sua ingestão se faz simultaneamente com alimentos ricos em carboidratos ou gorduras, os quais retardam a absorção e o peristaltismo respectivamente, prolongando o tempo de permanência do álcool no estômago. Assim, a concentração de álcool que chega à corrente sanguínea (alcoolemia) é consideravelmente menor (MEAD & SARKAR, 2014, BOBE & BODE, 1997).

A diluição da bebida alcoólica é outro fator de extrema importância para a alcoolemia. Bebidas destiladas com 40% de álcool como o uísque, por exemplo, retardam o esvaziamento

gástrico e inibem a absorção do álcool; enquanto bebidas com concentrações entre 20% a 30% elevam a alcoolemia em um curto período de tempo. Quando no sangue, as moléculas de EtOH são transportadas para todos os tecidos que têm células com alta concentração de água como cérebro, fígado, coração e rins (ZAKHARI, 2006).

Quando no fígado, a oxidação do EtOH pode ser realizada por meio de três caminhos distintos nos hepatócitos: via desidrogenase alcoólica (ADH), que ocorre no citosol da célula, via sistema microssomal de oxidação de EtOH no retículo endoplasmático ou via catalase nos peroxissomas. Todos estes processos de oxidação do EtOH produzem metabólitos específicos e resultam na produção de acetaldeído, composto altamente tóxico (SETSHEDI, 2010, ZAKHARI, 2006) que em grandes concentrações, principalmente no cérebro, ocasiona danos ao organismo. O acetaldeído formado pelas três vias será oxidado em acetato e água pela enzima metabolizadora aldeído desidrogenase (ALDH) e na fase final do metabolismo, o acetato é convertido em acetil coenzima A (Acetil CoA) que entrará no ciclo do ácido cítrico, transformando-se em dióxido de carbono e água (SETSHEDI et al., 2010; ZAKHARI, 2006).



**Figura 1.** Resumo do metabolismo do EtOH através das três vias: Álcool desidrogenase (ADH), catalase (CAT) e sistema microssomal de oxidação do etanol (MEOS). Fonte: Adaptado de CISA (2018).

A concentração máxima de EtOH na corrente sanguínea é atingida após trinta a noventa minutos e seus efeitos dependerão da alcoolemia. O cérebro por sua vez responde à concentração ascendente de álcool no sangue e geralmente o indivíduo desmaia antes mesmo de ingerir uma dose letal, porém diferentemente das células do fígado que podem se regenerar

após a exposição excessiva de álcool, as do cérebro não possuem essa capacidade (ZAKHARI, 2006). A tabela 1 mostra a relação alcoolemia e sintomatologia.

## 1.2 Efeitos do Etanol no Sistema Nervoso Central

Os efeitos do consumo de álcool são sentidos em vários sistemas orgânicos. Entretanto, os sistemas digestório e nervoso são especialmente vulneráveis à exposição ao EtOH. Como toda droga psicotrópica, atua no sistema nervoso central (SNC) podendo causar dependência e mudança no comportamento em quaisquer idades e situação socioeconômica (OMS, 2014).

Consumido de forma aguda pode levar à alteração das funções cognitivas, as quais podem persistir nas fases iniciais da abstinência. Os efeitos do consumo crônico são mais significantes e preocupantes no âmbito da qualidade de vida de seus usuários. O consumo **crônico contínuo** culmina em deterioração das funções neurológicas, produzindo alterações morfológicas e neuroquímicas no SNC. Por outro lado, o consumo **crônico intermitente**, equivalente ao consumo de fim de semana, promove uma queda do metabolismo energético dos sistemas neuronais, contribuindo para o processo de neurodegeneração e deterioração das funções cerebrais (GARCIA-MORENO et al, 2008).

Percebe-se a intoxicação alcoólica por um desequilíbrio das funções excitatórias e inibitórias do encéfalo onde os indivíduos passam por dois períodos, um que estimula o SNC podendo ocorrer euforia e desinibição, outro que deprime levando ao descontrole, falta de coordenação motora e sono (CISA, 2018). Esse paradoxo é explicado pelo efeito dose dependente do álcool. Concentrações sanguíneas abaixo de 50mg/dl de EtOH causam um efeito semelhante ao de estimulantes, de 50 a 100 mg/dl o efeito depressor reflete distúrbios no equilíbrio, concentração e aumento do tempo de resposta e concentração entre 100 em 150 mg/dl percebe-se ataxia, fala arrastada e prejuízo da função motora e mental, incluindo distúrbios na memória de curta duração. Concentrações acima de 150mg/dl levam progressivamente à perda dos sentidos, coma e morte por parada respiratória (Tab. 1). Portanto, sendo consumido em excesso e em padrão binge, o álcool é visto como um sério problema de saúde, já que esse excesso pode estar associado a acidentes de trânsito, violência e doenças (CISA; SINFORIANI et al, 2011).

Quando comparado com outras substâncias de abuso, o EtOH possui estrutura química simples e baixa toxicidade enquanto outras drogas que mesmo em baixas doses, podem provocar intoxicação mais rápida e significativamente. Entretanto, EtOH é uma substância que facilmente atravessa a barreira hemato-encefálica, interferindo sobre diferentes sistemas



neurotransmissores como o gabaérgico, glutamatérgico, opióide, serotoninérgico, noradrenérgico e colinérgico (TABAKOFF, et al., 1983; KORPI, 1994). Tais interações estão associadas a alterações comportamentais e cognitivas, adicionadas de déficit de memória, linguagem, atenção, aprendizagem, habilidades visuo-espaciais, funções executivas, habilidades motoras e funcionamento social e adaptativo (KORPI, 1994).

O efeito depressor do SNC observado pelo uso do álcool está principalmente relacionado à sua afinidade por receptores GABA<sub>A</sub>. Este receptor está presente em mais de 20% dos neurônios cerebrais e é responsável pela inibição sináptica mediada pelo neurotransmissor GABA (ácido gama-aminobutírico), o principal neurotransmissor inibitório do SNC (WOODWARD, 1994). De fato, a interação do álcool com receptores GABA<sub>A</sub> pode explicar os efeitos ansiolíticos observados pelo seu uso.

Um conjunto substancial de evidências experimentais em humanos e animais demonstram a vulnerabilidade do sistema nervoso central para os efeitos do EtOH e que exposição ao EtOH durante a ontogenia cerebral pode causar anormalidades irreversíveis das estruturas e funções do cérebro (GUERRI et al., 2010; ARIAN et al., 2013). Na fase de transição entre a infância e a vida adulta, ou seja, na adolescência, o SNC ainda se encontra em desenvolvimento. Desta maneira, suas vias neuronais podem se tornar mais suscetíveis aos danos causados pelo álcool levando ao comprometimento de várias funções. Em um período repleto de mudanças físicas, psicológicas e sociais, sob os efeitos do álcool, os jovens ficam mais propensos a comportamentos de risco (LARANJEIRA, 2007).

### 1.2.1 Alterações Morfofuncionais do Cérebro na Infância e Adolescência

A adolescência é um período da vida que se estende dos doze (12) aos dezoitos (18) anos em humanos e em roedores, de vinte e oito (28) dias aos quarenta e dois (42) dias pós-natal (DPN). Durante a infância e adolescência são muitas as semelhanças compartilhadas entre as espécies de mamíferos como as alterações hormonais, comportamentais e neurais, justificando desse modo, o emprego de modelos animais para contribuição da pesquisa científica nessa fase do desenvolvimento humano (SPEAR, 2004).

O encéfalo adolescente em transição, apresenta diferenças anatômicas e neuroquímicas em relação ao adulto. A adolescência é um período de transição gradual entre a infância e a idade adulta, caracterizada por uma série de eventos que dificultam a percepção de seus limites de início e término do período. Vale ressaltar que a obtenção da maturidade sexual chamada de

puberdade, faz parte dessas transições que caracterizam a adolescência (CREWS et al., 2007; SPEAR, 2000).

Durante o desenvolvimento funcional do encéfalo, que se estende até o final da adolescência, ocorrem várias mudanças na sua morfologia, composição e volume. Na fase pré-natal e neonatal observa-se um aumento no peso do cérebro, mas é na infância e adolescência que ocorre a maturação das vias neuronais, que conectam regiões individuais significativamente importantes para o sucesso das funções cognitivas, motoras e sensoriais do encéfalo por todo desenvolvimento até a idade adulta (CREWS et al., 2007).

Em um período que abrange os primeiros anos da infância ocorrem mudanças rápidas no cérebro. As formas cerebrais se refinam numa complexa rede de conexões através de processos como sinaptogênese, poda e mielinização. Esse processo de gênese de conexões é biologicamente dirigido, entretanto pode ser moldado pelas experiências vivenciadas. Esse dinamismo ocorre durante toda a adolescência e o cérebro produz mais sinapses do que o necessário, tornando fundamental o processo de poda ou retirada das mesmas. O processo de mielinização também continua durante a primeira infância e é a principal causa do aumento no tamanho do cérebro de uma criança. Nos primeiros seis anos de vida, o cérebro atinge 90% do seu tamanho adulto, enquanto que durante a adolescência as maiores mudanças ocorrem nas regiões corticais relacionadas com atividades cognitivas e emocionais (CREWS et al. 2007, LOECHES e GUERRI, 2011). Ao longo da adolescência, a quantidade de substância branca aumenta de forma linear, ao passo que a quantidade de substância cinzenta segue um padrão de U invertido (GODTAY et al., 2004; TOGA e THOMPSON, 2003; SOWELL et al., 2004). Através do processo de poda sináptica, conexões não utilizadas são consideradas não essenciais, e eventualmente o cérebro poda-as para aumentar a sua eficiência, as usadas regularmente se tornam mais fortes e mais complexas devido ao aumento da mielinização. As primeiras áreas do cérebro podadas são aquelas que envolvem funções primárias, tais como áreas motoras e sensoriais (CREWS e LOECHES, 2011).

Alterações significantes são observadas em extensões secundárias e terciárias do córtex cerebral, o que não apenas abrange os componentes do córtex temporal, parietal, e pré-frontal, mas também as alterações em estruturas subcorticais chave dentro do lobo temporal medial, incluindo a amígdala, hipocampo e estruturas cerebrais com alta densidade de receptores de esteroides sexuais (GOGTAY et al., 2004; TOGA e THOMPSON, 2003; SOWELL et al., 2004).

Algumas mudanças mais significativas no cérebro em desenvolvimento ocorrem no córtex pré-frontal (CPF), cujo volume diminui da adolescência para a idade adulta jovem. O CPF é a parte mais anterior dos lobos frontais, altamente envolvido em funções cognitivas complexas. Além do gerenciamento das funções executivas e da memória de trabalho, esta área cortical, que integra informações provenientes de diversas regiões corticais e subcorticais, também tem um papel significativo no estado de alerta, estresse e emoção. Também contribui para tarefas específicas, como a recompensa comportamental, atenção, aprendizagem e memória. Durante a adolescência, a mielinização e poda sináptica no córtex pré-frontal aumenta, melhorando a eficiência do processamento de informações e as conexões neurais entre o córtex pré-frontal e outras regiões do cérebro são reforçadas (PASCUAL et al., 2014). Por causa de suas funções de elevada complexidade, um grande número de distúrbios neurológicos e psiquiátricos, em diferentes faixas etárias, envolvem, primária ou secundariamente, alterações desta região cortical ou de outras áreas cerebrais altamente relacionadas ao córtex pré-frontal (DE BELLIS et al., 2005; MEDINA et al., 2008).

### 1.2.2 Efeitos do Etanol no Cérebro em Desenvolvimento

Uma série de estudos publicados na última década sugeriu que *binge drinking* pode ter, em longo prazo, consequências adversas durante este estágio de maturação do cérebro. Estudos relatam déficits comportamentais e cognitivos resultantes da neurotoxicidade sobre cérebro adolescente altamente vulnerável, assim como aumento da predisposição à dependência ao álcool e vício na idade adulta (OLIVEIRA et al., 2015; CANTACORPS et al., 2018; FERNANDES et al., 2018; GUERRI & PASQUAL, 2010; MAYNARD & LEASURE, 2013; PASCUAL et al., 2014)

As manifestações comportamentais características da adolescência são, aumento da impulsividade, ansiedade, busca de sensações de riscos e baixos níveis de prevenção de danos (CREWS e HODGE, 2007). As mudanças nessa fase são decorrentes das alterações hormonais, o que pode explicar o padrão de início de consumo do álcool e de drogas (CECCARELLI et al., 2007; WITT, 2007). Outro aspecto importante é o desenvolvimento tardio dos circuitos do córtex pré-frontal (CPF) envolvidos no julgamento e controle inibitório. Danos induzidos pela intoxicação alcoólica nesta região, podem também predispor os adolescentes a comportamentos impulsivos e desconsideração às consequências negativas, aumentando o risco de abuso de drogas (CREWS & BOETTIGER, 2009).

O álcool é uma substância depressora das funções cerebrais e do SN, podendo induzir mudanças morfofuncionais de modo considerável, promovendo uma deterioração neurofisiopsicológica. Como é um potente tóxico celular, pode promover a morte das células, bem como de afetar o processo de proliferação, apresentando efeitos graves sobre as células neurais em desenvolvimento, sendo igualmente prejudicial às células diferenciadas como evidenciado em estudos *in vitro* (BOTELLA, 2003).

Pesquisas clínicas e experimentais demonstram que o álcool afeta funções cerebrais de adolescentes e adultos de forma diferente. Os adolescentes são mais vulneráveis aos efeitos deletérios do álcool sobre funções comportamentais (ZEIGLER et al., 2005). As anormalidades estruturais são evidenciadas (De BELLIS et al, 2005; MEDINA et al., 2008) especialmente nas áreas envolvidas no processamento de memória e aprendizagem, tais como o hipocampo e o córtex pré-frontal (PFC) de adolescentes com transtornos relacionados ao uso do álcool (AUD).

Os adolescentes que deram início ao consumo de EtOH mais precocemente, quando em comparação com os indivíduos que começaram mais tarde, apresentaram menores volumes do hipocampo (DE BELLIS et al., 2000; NAGEL et al., 2005) e estes efeitos são independente de outros transtornos de conduta de comorbidade (NAGEL et al., 2005). Estudos de neuroimagem mostraram ainda anormalidades no PFC, incluindo as diferenças de substância branca em adolescentes com AUD (De BELLIS et al, 2005; MEDINA et al., 2008).

As anormalidades volumétricas no CPF são vistas nos jovens dos dois gêneros com AUD, entretanto em mulheres esses volumes de contrapartes mostram-se menores do que em homens que, por sua vez, apresentam volumes maiores em comparação com controles do mesmo sexo. Estudos de neuroimagem funcional reportam que indivíduos homens com AUD aumentam ativação frontal, ao passo que as mulheres exibem limitada ativação frontal em resposta à memória de trabalho espacial (MEDINA et al., 2008).

O EtOH também induz a maiores deficiências no funcionamento do cérebro e no volume de substância cinzenta no sexo feminino do que nos homens, sugerindo que os adolescentes do sexo feminino são mais vulneráveis do que os homens aos efeitos adversos do álcool, e podem ter um risco aumentado de déficits comportamentais. Mulheres alcoólatras também parecem ser mais suscetíveis a redução da massa cinzenta do lobo frontal do que os homens (CALDWELL et al., 2005; HOMMER et al., 2001). Essa vulnerabilidade feminina pode ser influenciada, entre outros fatores, pela expressão de genes relacionados à maior neurotoxicidade álcool-induzidas em mulheres, aumentando a concentração de álcool no sangue apesar de padrões de beber semelhantes e diferenças de metabolismo do álcool

(HASHIMOTO & WIREN, 2008). Diferenças hormonais nos receptores em resposta ao álcool podem também desempenhar um papel importante nestas diferenças de gênero. Níveis de receptores hormonais estão associados com diferenças de gênero no funcionamento do cérebro durante tarefas espaciais e também com alterações induzidas pelo álcool em distribuições hormonais, o que poderia explicar parcialmente as diferenças de gênero observadas nas anormalidades neurais álcool-relatadas (KIM et al., 2003; WILLIAMS & MECK, 1991).

Modelos animais de exposição binge ao EtOH replicam o padrão de dano cerebral visto em humanos que bebem em binge (MAYNARD e LEASURE, 2013). Esses modelos têm demonstrado déficits motores e de aprendizagem complexos associados com menor volume do lóbulo paramediano do cerebelo e diminuição do número sinapses de fibras paralelas sobre as células de Purkinje. A exposição neonatal diminuiu também o número de células de Purkinje, independentemente do tipo de exposição, sendo mais prejudicial nos dias pós-natal (DPN) 4-6. Deficiências motoras são sinais comuns de transtornos de espectro alcoólico fetal (FASD) em seres humanos, em parte devido aos efeitos do EtOH sobre o cerebelo. Alguns trabalhos mostram crianças com prejuízos na coordenação motora de olho e mão e vermes cerebelares de menor volume quando comparado com controles pareados de mesma idade (GUERRI et al., 2007).

Perdas celulares hipocampais são vistas em modelos animais de exposição ao álcool, assim como diminuição da neurogênese no giro denteado (GD), uma região neurogênica no cérebro adulto. Esses efeitos combinados, morte celular mais diminuição da neurogênese estão associados com uma grande perda de neurônios granulares do GD logo após exposição única binge (MAYNARD e LEASURE, 2013).

### **1.3 Aspectos Morfofuncionais da Memória e Aprendizagem**

O entendimento dos mecanismos de funcionamento da memória e as estruturas encefálicas envolvidas em sua formação constitui um dos grandes desafios da ciência. Existe dificuldade de até mesmo defini-la, uma vez que a memória não é um “bloco” único, mas diversos sistemas agrupados sob um mesmo nome (ROEDIGER et al. 2007). E mais, depende também da especialidade na qual será aplicada. Segundo Kandel (2014), a identidade do indivíduo é construída a partir de experiências vivenciadas e armazenadas em suas memórias. Uma das definições mais usadas é a de memória como a capacidade de guardar a informação aprendida para posteriormente ser utilizada. Para Izquierdo (2011), memória é a aquisição, a formação, a conservação e a evocação de informações.

A fase de aquisição é também chamada de aprendizagem e a de evocação, recuperação e lembrança. A memória é uma das funções cognitivas mais complexas que a natureza produziu, e as evidências científicas sugerem que o aprendizado de novas informações e o seu armazenamento causam alterações estruturais no sistema nervoso. As memórias são codificadas por neurônios, armazenadas em redes neurais e evocadas por essas mesmas redes ou outras. São moduladas pelas emoções, pelo nível de consciência e pelo estado de animosidade (LENT, 2010).

Devido ao substancial número de pesquisas e o avanço tecnológico, atualmente se conhece melhor os mecanismos de funcionamento da memória e das estruturas cerebrais relacionadas em sua formação, mas muitas questões permanecem em discussão. Existem diferentes tipos de memória, e determinadas regiões cerebrais são muito mais importantes para alguns tipos que para outros. Soma-se a isso o fato de que diferentes tipos de memória são armazenados em sistemas neurais distintos (KANDEL, SCHWARTZ, JESSEL, 1997).

### 1.3.1 Localização e Tipos de Memórias

A primeira sugestão de que alguns aspectos da memória têm localizações específicas no cérebro humano, surgiu em 1938, com o trabalho do neurocirurgião Wilder Penfield (SQUIRE, 1992ab). Penfield foi o pioneiro no tratamento neurocirúrgico da epilepsia focal porque desenvolveu uma técnica de estimulação elétrica que propiciava a ressecção cirúrgica, minimizando o dano às funções corticais do paciente. Utilizando este método, verificou, ocasionalmente, que a estimulação elétrica produzia o que chamou de resposta experiencial, na qual o paciente descrevia uma recordação coerente de uma experiência anterior (KANDEL, SCHWARTZ, JESSEL, 1997; KANDEL, 2014). Essas respostas, semelhantes à memória, só eram produzidas por estimulação exclusiva dos lobos temporais. Entretanto, todos os pacientes estudados por Penfield apresentavam focos epilépticos no lobo temporal, e os locais de onde eram provocadas essas respostas experienciais eram próximos a esses focos. Desse modo, as respostas experienciais poderiam ser resultado de atividade convulsiva localizada (KANDEL, SCHWARTZ, JESSEL, 1997).

O papel dos lobos temporais na memória foi melhor definido no início da década de 50 através dos estudos de Brenda Milner sobre os efeitos terapêuticos da ablação bilateral do lobo temporal em pequeno grupo de pacientes portadores de epilepsia temporal (LENT, 2008; SCOVILLE & MILNER, 1957). O primeiro caso melhor estudado dos efeitos da remoção de partes dos lobos temporais sobre a memória foi o de um paciente que sofria de crises epilépticas

intratáveis farmacologicamente há mais de 10 anos. Esse paciente, Henry Molaison, era incapaz de trabalhar ou de levar uma vida normal. Como último recurso de tratamento, foi removida a superfície do lobo temporal em ambos os lados do encéfalo, incluindo o hipocampo (ablação da parte medial dos lobos temporais). Esse tratamento experimental foi efetivo em relação à epilepsia, mas imediatamente após a cirurgia, Henry passou a apresentar um devastador déficit de memória. Lembrava-se dos eventos que precederam a cirurgia e, nitidamente, dos eventos de sua infância, mas quando aprendia uma nova tarefa era incapaz de reter essa informação por mais de um minuto. Desde a época de sua cirurgia, em 1953, Henry ficou incapacitado de converter uma nova memória de curto prazo em uma memória permanente, de longo prazo (KANDEL, SCHWARTZ, JESSEL, 1997). O prejuízo cognitivo desse paciente se restringiu à aquisição de memórias de longa duração. Essa incapacidade de reter informações aprendidas após a cirurgia é conhecida como amnésia anterógrada. A partir daí, se tem conhecimento de que o hipocampo é uma estrutura fundamental para a consolidação da memória.

Entretanto, além de seu papel fundamental na aprendizagem e memória, o hipocampo exerce um importante mecanismo de retroalimentação negativa sobre o eixo hipotálamo-hipofisário adrenal (HPA), e, portanto, está intimamente relacionado com a modulação da emoção (HERMAN et al., 2005; RUSSO et al., 2012). Uma série de estudos experimentais mostrou que o hipocampo não atua como uma estrutura unitária, e que seu papel fisiológico pode ser dividido em duas importantes áreas topográficas: a porção dorsal e a porção ventral. De acordo com essa divisão, a porção dorsal está diretamente envolvida com funções cognitivas como aprendizagem e memória espacial e contextual. Por outro lado, a porção ventral participa preferencialmente nos processos relacionados ao estresse e ansiedade. Neste sentido, além da questão cognitiva mediada pela porção dorsal, o hipocampo também poderia estar participando ativamente na sensibilização locomotora através da modulação de aspectos emocionais, via porção ventral (BANNERMAN et al., 2004, FANSELOW e DONG, 2010).

Acredita-se que as memórias consistam basicamente na modificação da forma e, portanto, da função das sinapses que intervieram na formação dessas memórias. A maioria das informações que constituem memórias é aprendida através dos sentidos em episódios que são denominados experiências. Algumas, porém são adquiridas pelo processamento interno de memórias preexistentes, modificadas ou não, o que, em inglês, se chama *insight*. Há tantas memórias possíveis como há experiências e *insights*. Porém, é útil classificar as memórias de acordo com sua função, conteúdo e duração (IZQUIERDO, 2011).

Os seres humanos possuem pelo menos dois sistemas qualitativamente diferentes de armazenamento da informação, que são normalmente designados como memória declarativa ou explícita e não-declarativa ou implícita (também chamadas de "memória de procedimento" ou "procedimental") (KANDEL, et al., 2014; EICHENBAUM, 2001). De maneira ampla, a memória **declarativa** refere-se ao armazenamento do material que está disponível à consciência, podendo ser verbalizado (expresso mediante a linguagem), e a memória **não-declarativa** refere-se àquela memória não disponível à percepção consciente, pelo menos não de forma detalhada, estando associadas a comportamentos, hábitos e habilidades (KANDEL, 2014). Incluem-se nesta segunda categoria atividades motoras complexas, como dirigir um automóvel, tocar piano ou andar de bicicleta.

Segundo o critério temporal, a memória é classificada de acordo com o tempo que permanece disponível após a aquisição. Memória de **longa duração ou longo prazo** (MLP) é a que pode ser evocada dias, semanas ou anos depois de formada. Quando a memória puder ser evocada por um curto período após sua aquisição, é chamada de memória de **curta duração ou curto prazo** (MCP). Memória **imediate** (MI) é aquela que se mantém alguns segundos durante uma atividade. (IZQUIERDO et al., 1998; McGAUGH, 2002). Apesar de existir uma proposta de reclassificação de tipos de memória, de modo a enquadrá-las baseado em sua forma e estrutura, as nomenclaturas clássicas ainda predominam (HENKE, 2010).

Embora o hipocampo esteja intimamente envolvido na formação de novas memórias, tem sido sugerido que ele armazena conteúdos por um período de tempo limitado após a aprendizagem. Com o passar do tempo, seu papel na memória diminui e uma memória mais permanente torna-se gradualmente independentemente da formação hipocampal, sendo, provavelmente, armazenada no neocórtex (ZOLA-MORGAN & SQUIRE, 1990).

Importantes contribuições acerca dos sistemas encefálicos responsáveis pelo armazenamento de curta duração da informação declarativa foram obtidas dos estudos clínicos da amnésia após lesão/ressecção cirúrgica. Através dos mesmos, temos evidências da importância do diencéfalo e das estruturas do lobo temporal medial (em especial o hipocampo) para o estabelecimento de novas memórias declarativas (PURVES et al., 2005).

Foi demonstrado também que existe um substrato anatômico diferente para a amnésia anterógrada, onde os eventos ocorridos após a lesão/doença não são lembrados e para a retrógrada, onde os eventos ocorridos antes da lesão (no momento ou meses e anos antes) não são lembrados, visto que todos os indivíduos apresentavam preservação da memória para

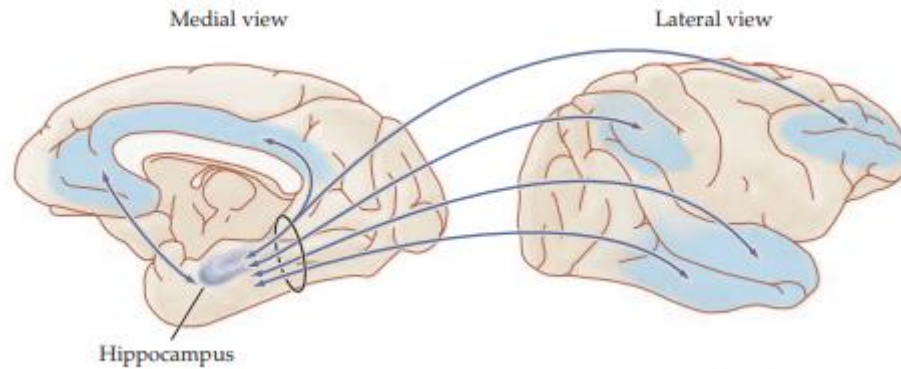


eventos prévios à lesão que desencadeou a amnésia. Os déficits evidenciados nos pacientes estudados consistem na incapacidade de estabelecer novas memórias.

Embora certo grau de déficits mnêmicos anteriores à lesão possa ocorrer em lesões mais focais, presume-se, a partir do estudo destes casos (lesões focais X déficits na formação de novas memórias), que o armazenamento de longo prazo esteja distribuído em todo o encéfalo. Assim, o hipocampo e as estruturas diencefálicas relacionadas formam e consolidam memórias declarativas que serão, por fim, armazenadas em outras áreas encefálicas (PURVES et al., 2005). É importante salientar, no entanto, que a memória não-declarativa destes pacientes permaneceu inalterada, indicando que este tipo de memória é consolidado em um diferente substrato anatômico.

Estudos com pacientes amnésicos têm mostrado que a formação das memórias declarativas depende da integridade de um subconjunto de circuitos límbicos, particularmente aqueles do hipocampo e suas conexões subcorticais com os corpos mamilares e o tálamo dorsal (PURVES et al., 2005). As áreas de processamento sensoriais do córtex recebem informações sobre os eventos externos e criam representações perceptuais dos estímulos. Então essas representações são lançadas às regiões corticais adjacentes que, por sua vez, enviam as representações processadas ao hipocampo. Este se comunica novamente com as regiões adjacentes, que estabelecem contato com o neocórtex. Gradativamente, com o passar dos anos, o hipocampo vai cedendo seu controle sobre a memória ao neocórtex, onde a memória parece manter-se.

Em suma, a memória declarativa ou explícita necessita de um amplo circuito neural. As estruturas envolvidas são as áreas de associação visual e de linguagem no neocórtex temporal, a amígdala e o hipocampo. Quando novas informações ou memórias são adquiridas, além do hipocampo, vão estar inclusos o diencefalo (hipotálamo-tálamo), o giro do cíngulo e o lobo frontal. A figura dois ilustra a circuitaria do processo mnemônico.



**Figura 2.** Hipocampo e as áreas e vias relacionadas ao processo mnemônico. Fonte: Purves et al. (2005)

### 1.3.2 Fisiologia da Memória

No final da década de 40, o psicólogo canadense Donald Hebb, através de sua obra “A Organização do Comportamento” propôs que as memórias no encéfalo de mamíferos estariam armazenadas em conexões sinápticas eficientes entre neurônios ativadas durante o aprendizado. Essa ideia levou em consideração a hipótese de que a atividade coincidente de dois neurônios conectados entre si determina um aumento na eficiência dessa conexão. Ou seja, quando um axônio pré-sináptico está ativo e simultaneamente o neurônio pós-sináptico está fortemente ativado pela influência de outras aferências, então a sinapse formada pelo axônio pré-sináptico está reforçada. Essa capacidade de modificação característica da sinapse, conhecida como plasticidade sináptica, explicaria ao menos em parte as mudanças adaptativas que ocorrem nos circuitos neuronais. A novidade de Hebb referia-se aos mecanismos sinápticos propostos para a formação de memórias ao nível das conexões neurais (MAREN e BAUDRY, 1995).

Em 1973, Timothy Bliss & Terje LÓmo descreveram a primeira evidência experimental de que estimulações elétricas breves e repetidas de alta frequência em uma sinapse no SNC de mamíferos são capazes de produzir um aumento persistente na força da transmissão sináptica que pode permanecer durante semanas. Tal fenômeno veio a ser denominado como “Long-term potentiation” ou LTP, e traduzido para o português como Potenciação de Longa Duração. Os autores avaliaram a consequência de uma estimulação elétrica repetitiva da via perfurante no giro dentado do hipocampo. A importância dos resultados alcançados com este experimento residia principalmente no fato de haver uma duração prolongada do aumento no potencial excitatório pós-sináptico (PEPS) após o estímulo, e o envolvimento de uma via identificável cortical (DOUGLAS & GODDARD, 2003; OLDS, 2003, BLISS & LÓMO, 1973). A comprovação de que a LTP poderia desenvolver-se dentro do modelo proposto por Hebb favoreceu significativamente a ideia de que este fenômeno seria a expressão celular da

memória e do aprendizado (SQUIRE, 1992ab). Além do mais, a via perfurante, onde foram primeiramente encontrados os efeitos da LTP, é uma das principais vias extrínsecas da formação hipocampal, uma região a muito relacionada com a memória e aprendizado. A LTP apresenta diversas características que a tornam uma candidata muito apropriada para o mecanismo do armazenamento de longa duração. Primeiro, ocorre em cada uma das três vias principais mediante as quais a informação flui no hipocampo: a via perfurante, a via das fibras musgosas e a via dos colaterais de Shaffer. Segundo, é induzida rapidamente e, por fim, depois de induzida ser estável. A associação entre LTP e plasticidade cerebral dá-se entre outros motivos, pelo fato de ocorrer um aumento na amplitude da resposta sináptica após a estimulação que pode ser mantido por horas ou dias, por haver envolvimento de mudanças estruturais específicas e pela possibilidade de formação de novas sinapses (COLTMAN et al., 2002, 2007). Após a estimulação tetânica para indução de LTP, foram percebidas alterações na forma das espinhas dendríticas e a existência de um número maior de sinapses na mesma região ou em áreas muito próximas (KANDEL et al., 2014).

Embora a LTP tenha sido primeiramente demonstrada nas sinapses da via perfurante em neurônios do giro denteado, a maior parte dos estudos hoje são realizados nas sinapses hipocampais que ocorrem entre a via colateral de Shaffer e os neurônios piramidais de CA1 em preparação de finas fatias de cérebro (BEAR, 1996). Sua fase inicial, a de indução, refere-se aos eventos que acionam o processo de modificação sináptica, a partir de um estímulo de alta frequência. Sabe-se do importante papel que os subtipos de receptores aminoacídéricos exercem nessa fase, devido a uma ampla gama de estudos com seus antagonistas (IZQUIERDO & MEDINA, 1995).

O neurotransmissor glutamato é o aminoácido livre mais abundante no SNC e 70% do seu total presente no tecido nervoso apresentam funções metabólicas (especialmente, biossíntese de proteínas). É o principal neurotransmissor excitatório de mamíferos participando de diversas funções cerebrais como cognição, aprendizado e memória e plasticidade neural (IZQUIERDO, 1994; DANDOLT, 2001). Promove alterações de longa duração na excitabilidade neuronal como a indução da LTP na transmissão sináptica em neurônios do hipocampo e do córtex visual e a depressão de longa duração (LTD) no cerebelo e córtex visual (ARTOLA & SINGER, 1987; ITO, 1989). Por outro lado, é amplamente conhecido que a excitação excessiva de seus receptores pode provocar danos ou morte neuronal, processo denominado de excitotoxicidade (OLNEY et al, 1980). O cérebro possui uma grande quantidade de glutamato (aproximadamente 5-15 nmol/kg dependendo da região), mas somente

uma pequena fração desse total é mantida extracelularmente. A concentração nos fluidos extracelulares e no líquido é em torno de aproximadamente de 3-4 $\mu$ M e 10 $\mu$ M, respectivamente. Conseqüentemente, o gradiente de concentração de glutamato através da membrana plasmática é muito grande e sua maior concentração é dentro dos terminais nervosas. Assim, a distribuição do glutamato neste equilíbrio dinâmico (liberação e captação) é fundamental para sua ação, pois não existem enzimas extracelulares que o metabolize com eficiência (DANBOLT, 2001).

A diversidade funcional do glutamato como neurotransmissor é devida a grande variedade de receptores existentes que podem ser classificados de acordo com suas propriedades farmacológicas e fisiológicas. No geral é dividido em duas classes: receptores ionotrópicos (iGluR) e metabotrópicos (mGluR) (OZAWA et al., 1998). Os iGluR são canais iônicos que permeiam a passagem de cátions específicos, e sua ativação promove a despolarização da membrana plasmática, desencadeando uma resposta excitatória. Estes se subdividem em receptores N-metil-D-aspartato (NMDA), ácido  $\alpha$ -amino-3-hidróxi-5-metil-4-isoxazol propiônico (AMPA) e ácido caínico ou cainato (KA). Os receptores AMPA e KA são também chamados de não-NMDA. Os receptores AMPA são amplamente distribuídos no SNC, com predomínio nas regiões do hipocampo (CA1 e CA3) e camada molecular do cerebelo (COLTMAN et al., 1995; OZAWA et al., 1998). Medeiam a neurotransmissão excitatória rápida e são canais com grande permeabilidade de Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup> e, principalmente, com baixa permeabilidade ao Ca<sup>+2</sup>. Os receptores KA ao contrário dos receptores AMPA são potencialmente permeáveis ao íon Ca<sup>+2</sup> (OZAWA et al., 1998). Os receptores NMDA são amplamente distribuídos em todo encéfalo e medeiam a neurotransmissão excitatória no SNC, porém por vias diferentes dos receptores AMPA. São caracterizados por serem altamente permeáveis ao íon Ca<sup>+2</sup>, possuírem cinética de abertura lenta e dependente de voltagem, ou seja, a ativação do receptor NMDA e o influxo de íons através deste só ocorre se a membrana neuronal for previamente despolarizada, por exemplo, através da ativação de receptores do tipo AMPA, permitindo a saída do íon Mg<sup>2+</sup> que bloqueia este canal quando a membrana neuronal se encontra em estado de repouso (EDMONDS et al., 1995). Embora a ativação dos receptores NMDA ocorra mais lentamente do que a ativação dos receptores AMPA, esta se prolonga por um período maior após a liberação de glutamato na fenda sináptica. Como a neurotoxicidade glutamatérgica é mediada principalmente por um grande influxo de Ca<sup>+2</sup>, a ativação excessiva desses receptores tem sido relacionada à excitotoxicidade e danos subseqüentes como a morte neuronal (OZAWA et al., 1998). Os receptores metabotrópicos (mGluR) estão acoplados às proteínas ligantes de nucleotídeos da guanina (proteína G) e modulam a atividade de efetores

intracelulares, como a adenilato ciclase e fosfolipase C, responsáveis pela produção de segundos mensageiros (AMP cíclico, diacilglicerol e inositol-3-fosfato), os quais ativam e/ou inibem diversos eventos de sinalização celular (EICHENBAUM & COHEN, 2001).

Várias evidências apontam para o receptor de glutamato NMDA como estrutura chave para o início da LTP (COLLINGRIDGE et al., 1983; SHANKAR et al., 1998). Descrevendo-a brevemente pode-se dizer que a ativação do receptor NMDA leva ao influxo de cálcio na célula, e este, uma vez intracelular, ativa proteínas (por exemplo, a cálcio-calmodulina quinase II). Esta enzima ativa o receptor AMPA, o qual aumenta a condutância para o sódio e o potássio e por consequência a resposta celular ao glutamato (LYNCH, 2004). O influxo de cálcio leva também a ativação da enzima adenilato ciclase a qual produz o segundo mensageiro AMPc. Este ativa a proteína quinase C levando à fosforilação do fator de transcrição responsivo ao AMPc (CREB), à síntese proteica e mudanças na estrutura sináptica (EICHENBAUM & COHEN, 2001). Isso permite a conclusão de que a LTP apresenta características do próprio processo de memória, ou seja, pode ser formada rapidamente nas sinapses apropriadas e dura por um longo tempo. Entretanto, não se consegue provar que ela seja o mecanismo utilizado para o armazenamento da memória. Existem muitos outros neurotransmissores chamados de neuromoduladores: serotonina, dopamina, acetilcolina, noradrenalina. Estes modulam a memória e estão intimamente relacionados com o processamento das emoções, com o estado de animosidade e o nível de alerta dos indivíduos. Torna-se fácil aprender ou evocar algo quando se está atento e de bom humor, ao contrário, torna-se difícil aprender qualquer coisa ou até lembrar coisas simples quando se está cansado, deprimido ou muito estressado. Todo esse processo é regulado por sinapses noradrenérgicas, dopaminérgicas e serotoninérgicas. Ainda, a consolidação ou armazenamento da memória de longa duração é influenciado pelos "hormônios do estresse",  $\beta$ -endorfina, adrenocorticotropina (ACTH), os corticóides, adrenalina, noradrenalina e vasopressina circulantes. Todos esses hormônios atuam através do núcleo basolateral da amígdala (responsável pela mediação de memórias emocionais). Com exceção da  $\beta$ -endorfina, que inibe a consolidação da memória em qualquer dose, os demais "hormônios do estresse" melhoram a consolidação em níveis moderados e a inibem em doses ou concentrações elevadas. Isso explica o que chamamos de "branco" quando estamos excessivamente estressados.

Cada experiência vivenciada estimula o processo de plasticidade neuronal em diferentes espécies, que vão desde invertebrados aos humanos. Embora possamos armazenar tantas experiências quanto possível, podemos dizer que tão importante quanto o armazenamento de

informações é o seu esquecimento. O fenômeno do esquecimento é fisiológico e desempenha um papel adaptativo. Imagine só se fôssemos capazes de "guardar" tudo aquilo que vivenciamos com uma riqueza de detalhes, seria praticamente impossível, pois levaríamos boa parte do nosso tempo recordando cada detalhe vivenciado. No entanto, quando o esquecimento é patológico, e prejudica de maneira irreversível a vida cognitiva do indivíduo, estamos diante de um quadro de doença neurodegenerativa.

### 1.3.3 Modulação da Memória pelo Etanol

Os indivíduos que fazem uso abusivo do EtOH apresentam prejuízos físicos, psíquicos e sociais. O álcool etílico pode gerar doenças hepáticas, cardiovasculares, respiratórias e transtornos no sistema nervoso central e periférico. Dessa forma, compromete diversas funções cognitivas, provocando déficits na solução de problemas abstratos, aprendizagem viso-espacial e verbal, habilidades percepto-motoras, memória visual de curto-prazo, acuidade visual para estímulos em movimento, percepção de profundidade e sensibilidade ao contraste (HARPER & MATSUNOTO, 2005; FADDA & ROSSETTI, 1998; WEGNER; GÜNTNER; FAHLE, 2001).

O álcool difere da maioria dos outros depressores pelo fato de ser amplamente disponível e de seu uso ser legalmente aceito e estimulado em muitas sociedades. Regula a ansiedade, tem efeito sedativo e provoca prazer temporário. Os prejuízos decorrentes do uso de álcool são vistos em indivíduos em qualquer faixa etária, entretanto, em adolescente estes diferem dos evidenciados em adultos, seja por especificidades existenciais desta etapa de vida, seja por questões neuroquímicas deste momento do amadurecimento cerebral. Além disso, o consumo de álcool pelos adolescentes está associado a uma série de prejuízos acadêmicos. Esses podem decorrer de déficits mnemônicos, pois adolescentes com dependência de álcool apresentam mais dificuldades em recordar palavras e desenhos geométricos simples, em comparação com adolescentes que não são dependentes alcoólicos (PECHANSK et al., 2004).

Quando comparado como outras drogas de abuso, o álcool é considerado uma droga fraca por exercer seus efeitos farmacológicos na ordem de gramas. Entretanto, levando-se em consideração a simplicidade de sua estrutura química, seu mecanismo de ação é múltiplo e complexo, influenciando muitos sistemas de neurotransmissão, entre eles, o sistema glutamatérgico, colinérgico, gabaérgico, opioidérgico, catecolaminérgico e serotoninérgico, gerando alterações moleculares e celulares, o que leva às mudanças desses sistemas neurais

envolvidos. A natureza de suas ações o caracteriza como uma droga depressora do SNC (FADA & ROSSETTI, 1998).

O EtOH tem propriedade de interagir com a camada lipídica da membrana neuronal, alterando sua permeabilidade, fluidez e funções de suas proteínas. Como consequência, prejudica o funcionamento das ATPases, principalmente da bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , comprometendo a condução elétrica (ALOIA et al., 1985). Ao romper a barreira hematoencefálica, o EtOH atua nos receptores GABA, de forma similar aos benzodiazepínicos e inibindo o neurotransmissor glutamato (WONG et al., 2008). Inibem a abertura de canais de cálcio voltagem dependentes, impedindo a liberação de neurotransmissores após a despolarização. Também exerce efeito inibitório sobre os receptores NMDA e sobre o transporte de adenosina para o meio intracelular (MELENDEZ E KALIVAS, 2004). Vários estudos revelam a influência do álcool na liberação de neurotransmissores como dopamina, serotonina, noradrenalina e peptídeos opióides (BROADBENT et al., 1995; HERZ, 1997; BADAWY, 1998; LE et al., 2005).

Estudos têm mostrado que o sistema de neurotransmissores pode ser afetado de forma drástica e decisiva, como na síndrome de Werneck–korsakoff causada pelo uso abusivo do EtOH, que se sabe causar danos em várias funções cerebrais, como cognitivas e mnemônicas. As causas dessas síndromes estão relacionadas ao alcoolismo principalmente provocando a carência da vitamina B1; entre os sintomas mais observados estão as confabulações e um grau avançado de amnésia. De acordo com Teotônio; Carvalho et al. (2011), os portadores desta síndrome, apresentam lesões em estruturas cerebrais como o hipotálamo e hipocampo.

O EtOH age diretamente nos receptores gabaérgicos, entre esses, o mais investigado é o GABA<sub>A</sub>. Esses receptores são canais iônicos regulados por ligantes, permeáveis aos íons cloreto, e dependendo de sua composição podem ser mais ou menos sensíveis ao EtOH. O neurotransmissor GABA (ácido  $\gamma$ -aminobutírico) é o principal aminoácido inibitório com ampla ação sobre os receptores GABA<sub>A</sub> e GABA<sub>B</sub>, entretanto, sua ação inibitória facilitada pelo EtOH se faz via receptor GABA<sub>A</sub>. A ação sobre o receptor GABA<sub>B</sub> está sendo investigada e acredita-se que a ativação pré-sináptica desses receptores previna a liberação de GABA, a qual é potencializada na presença de EtOH, levando assim à tolerância induzida por essa droga (FADA e ROSSETI, 1998; LOVINGER, 2008). Quando o álcool se liga ao receptor GABA<sub>A</sub> potencializa os efeitos inibitórios especialmente no córtex cerebral. Esse aumento da inibição cortical provoca a sensação de diminuição da ansiedade e de relaxamento do organismo (PAUL, 2006).

A potencialização da transmissão gabaérgica parecer contribuir com vários aspectos da intoxicação aguda por EtOH, como incoordenação motora, efeitos ansiolíticos e sedação. Quanto aos aspectos relacionados à exposição crônica, foi descrita redução na sensibilidade da atividade gabaérgica (GABAa) ao EtOH, como consequência de alterações nas subunidades desse receptor, com a ressalva de que dependendo da região cerebral, essa transmissão pode aumentar ou diminuir. Na abstinência, o efeito predominante é a superexcitabilidade podendo levar a ansiedade e até mesmo convulsões (LOVINGER, 2008).

O EtOH também exerce sua ação sobre os receptores glutamatérgicos do tipo NMDA, receptores ionotrópicos regulados por ligantes. Agudamente o EtOH é capaz de inibir a transmissão sináptica glutamatérgica, principalmente mediada pelos receptores NMDA. Sendo o NMDA envolvido com a memória e aprendizagem, os efeitos deletérios do EtOH sobre a memória podem envolver a inibição desse receptor. O NMDA é sensível à administração aguda de 5 a 100mM (0,23 a 4,6g) de EtOH (BHAVE et al., 1996), correspondente ao limite mínimo para produzir intoxicação in vivo. No entanto, cronicamente, o EtOH parece induzir o aumento adaptativo na função do receptor NMDA através de alterações na composição de suas subunidades, ou a partir da resposta da hiperregulação derivada da supressão a longo prazo desse receptor, ou seja, um aumento compensatório na sensibilidade ao neurotransmissor. Acredita-se que esse aumento esteja envolvido com a hiperexcitabilidade durante o período de abstinência (LOVINGER, 2008).

Quando ingerido em doses elevadas e cronicamente, o álcool pode induzir doenças como cirrose hepática, pancreatite, cardiopatias, úlceras, epilepsia, entre outros danos (OMS, 2003). Entretanto, uma das consequências mais importante é a perda cognitiva. Segundo Givens e McMahon (1995), o álcool pode prejudicar a LTP e interferir nas células de lugar do hipocampo através do bloqueio dos receptores NMDA, o que explica parcialmente os seus efeitos deletérios sobre a memória e outras funções cognitivas e danos neurológicos irreversíveis como perda da massa cortical e aumento de volume ventricular, que levam à demência irreversível, como a já citada síndrome de Wernick-Korsakoff, comprometimento motor e neuropatias periféricas (HARPER E MATSUMOTO, 2005, CENTERWALL E CRIQUI, 1978).

As evidências também indicam um papel dos receptores NMDA no desenvolvimento de tolerância e dependência de álcool, e os receptores NMDA podem participar da síndrome de abstinência do álcool. Assim, embora os receptores de GABA tenham papel fundamental na



mediação dos efeitos do álcool, a capacidade de o álcool interagir com diversos tipos diferentes de receptor sugere que ainda não se conhecem por completo seus mecanismos de ação.

#### 1.4 Estresse Oxidativo

O metabolismo do álcool descrito anteriormente gera estresse oxidativo e seu consumo está associado a várias alterações na função celular e no sistema oxidante-antioxidante. O estresse oxidativo se estabelece quando ocorre desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e a sua remoção através de sistemas antioxidantes enzimáticos ou não enzimáticos. Pode-se dizer que um organismo se encontra em estresse oxidativo quando ocorre um desequilíbrio entre os sistemas pró-oxidantes e antioxidantes, de maneira que os primeiros sejam predominantes (VASCONCELOS et al., 2007; NOGALES et al., 2014).

Radical livre é um átomo ou molécula que possui um número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica. Isso o torna instável e altamente reativo, fazendo com que esteja sempre buscando capturar ou ceder elétrons das células à sua volta. Portanto, os radicais livres são formados em um cenário de reações de óxido-redução, isto é, doam o elétron solitário, oxidando-se, ou recebem outro, reduzindo-se (FERREIRA e MATSUBARA, 1997). Quando o elétron desemparelhado se encontra nos átomos de oxigênio ou nitrogênio ele recebe a denominação de espécie reativa de oxigênio (ERO) ou espécie reativa de nitrogênio (ERN), respectivamente. O oxigênio é essencial para a oxidação de compostos orgânicos e produção de energia para o metabolismo celular (COMHAIR & ERZURUM, 2002). Uma pequena quantidade do oxigênio consumido (2 a 5%) é reduzida produzindo as EROs que podem provocar injúria tecidual e, em altas concentrações, danificar organelas celulares, ácidos nucleicos, lipídeos e proteínas (KINNULA et al., 1995).

Normalmente, os mecanismos de geração de radicais livres ocorrem nas mitocôndrias, membranas celulares e no citoplasma e esses mecanismos podem ser favorecidos pelos íons ferro e cobre. Exemplos de radicais livres são, o radical hidroxila ( $\text{OH}\cdot$ ), o radical ânion superóxido ( $\text{O}_2^-$ ), o radical peróxido nítrico ( $\text{ONOO}\cdot$ ) e o óxido nítrico ( $\text{NO}$ ) (ARUOMA, 1994; YU, 1994). Existem compostos igualmente reativos quanto os radicais livres que não possuem elétrons desemparelhados na última camada como o peróxido de hidrogênio e o oxigênio singlete e, portanto, não podem ser chamados de radicais livres. Essas substâncias são classificadas de maneira mais ampla como espécies reativas de oxigênio (EROS) ou espécies reativas de nitrogênio (ERNS) e incluem o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), o cátion nitrosonium

(NO<sup>+</sup>), ânion nitroxila (NO<sup>-</sup>) e o peróxido nitrito (ONOO<sup>-</sup>) (ARUOMA, 1994; MUKHERJEE, 2014).

A maior reatividade exibida pelos radicais livres, comparativamente a outros elementos, é consequência do menor tempo de vida média que possuem. Os radicais OH<sup>·</sup> e O<sub>2</sub><sup>-</sup> possuem meia vida extremamente curta devido à instabilidade eletrônica que apresentam. Isto resulta na possibilidade de extraírem elétrons de outras moléculas com as quais venham a colidir, promovendo formação de outras espécies de radicais como o ONOO<sup>-</sup> e RO<sup>-</sup>, formados durante a lipoperoxidação (LPO) das membranas celulares (HALLIWELL, 1989; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1989).

Os radicais livres, que são formados constantemente no metabolismo celular normal e em vários eventos patológicos, quando em excesso, podem ocasionar a oxidação de moléculas biológicas. Um dos principais mecanismos de lesão é a LPO, ou seja, a oxidação da camada lipídica da membrana celular. Consequentemente, há perda da seletividade na troca iônica e liberação do conteúdo de organelas, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomas, e formação de produtos citotóxicos como o malondialdeído (MDA), culminando com a morte celular. Como o MDA é o produto final da peroxidação de ácidos graxos poli-insaturados, constitui um biomarcador para este tipo de dano, e indicativo de liberação excessiva de EROs. Além disso, o estresse oxidativo pode gerar danos a proteínas e ao DNA, provocando diversas alterações na função celular e tecidual pelo comprometimento também, dos componentes da matriz extracelular (LIU et al., 2011; YANG et al., 2015).

No combate ao excesso de EROs e ERNs, as células dispõem de uma variedade de mecanismos de defesa antioxidante contra os danos causados por estas espécies. Este conjunto de mecanismos caracteriza o sistema de defesa antioxidante, o qual é formado por compostos enzimáticos e não-enzimáticos, produzidos endogenamente ou absorvidos através da dieta. Os antioxidantes são substâncias presentes em concentrações baixas comparadas às concentrações do substrato oxidável, entretanto, previnem ou regeneram significativamente a oxidação destes substratos (KOCH, 2004).

As moléculas com propriedades antioxidantes, não enzimáticas são obtidas da dieta como o betacaroteno, selênio,  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E), ácido ascórbico (vitamina C), cobre, zinco, entre outros, que diminuem a ação tóxica das EROS produzidas intra e extracelularmente (KINNULA e CAPRO, 2006; SEN et al. 2001; YU, 1994). Entretanto, o principal sistema de defesa antioxidante é constituído por enzimas como as superóxidos dismutases (SOD), a catalase (CAT) e a glutathiona peroxidase (GPX) para decomponem respectivamente o ânion O<sub>2</sub>,

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e lipoperóxidos (YU, 1994). A Glutathiona redutase (GR) é uma enzima importante na remoção de radicais, mas é responsável pela regeneração da glutathiona oxidada (GSSG) em sua forma reduzida (GSH), utilizando como substrato da enzima glutathiona peroxidase (GPX) (YI et al., 2014).

Apesar das defesas antioxidantes reduzirem os riscos de lesões oxidativas por EROS, os organismos podem vivenciar situações onde a proteção é insuficiente. Obviamente, acontece um desequilíbrio entre a produção de EROS e defesa antioxidante se estabelecendo o estresse oxidativo (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989).

### **1.5 Exercício Físico e o Sistema Nervoso**

Atividade física é todo e qualquer movimento corporal que realizamos na nossa rotina diária, como por exemplo, tomar banho, varrer, cozinhar, caminhar, atender ao telefone, enfim, qualquer movimento executado pela contração da musculatura esquelética que envolva gasto energético maior do que os níveis de repouso. O exercício físico exige um esforço físico do corpo com gasto energético bem maior comparável aos níveis de repouso, se traduz como a atividade física planejada, estruturada e repetitiva com objetivos claros na manutenção da saúde e bem-estar geral dos indivíduos (DISHMAN et al., 2006).

O exercício físico contínuo é um dos fatores que promove um estilo de vida mais saudável. Constitui um parâmetro sobre condições fisiológicas como atividade cardíaca, temperatura, pressão arterial, frequência respiratória e atividade muscular, cujas variáveis estão relacionadas com um organismo saudável (HUESTON et al., 2017; WILMORE e COSTILL, 2001). O exercício físico tem a capacidade de induzir alterações na composição e perfil lipídico do corpo. Promove a manutenção da homeostase glicêmica, aumentando a sensibilidade periférica à insulina e a captação da glicose. Fornece benefícios psicológicos confirmados por Duman (2005) em pacientes com depressão leve à moderada. Favorece a integração social e melhora a autoestima, ou seja, age melhorando o estado psicossocial em geral dos indivíduos.

Levantamentos epidemiológicos demonstram que o exercício físico regular diminui as disfunções relacionadas ao estilo de vida (RADAK et al, 2006), reduz a incidência de tumores (MAHABIR et al, 2006; PATEL et al, 2008) e riscos de acidentes vasculares cerebrais (AVCs) bem como a mortalidade relacionada aos mesmos (TAHAMTAN, et al., 2013; LEE e PANFFENBARGER, 1998). Melhora a perda neuronal relacionada com a idade e é atualmente recomendado como um auxílio terapêutico em várias doenças neurodegenerativas (FARZANA et al, 2013). Promove melhora das funções cognitivas (DI WANG et al., 2018; FARZI et al,

2018; XIAFENG et al., 2013). Induz neuroproteção através de seu efeito antiinflamatório (GOMES DA SILVA et al., 2013; CHENNAOUI et al., 2015).

Devemos considerar o paradoxo em relação aos efeitos da prática do exercício físico, pois o mesmo gera aumento no consumo de oxigênio e, conseqüentemente a geração de espécies reativas ao oxigênio (EROs) (BOVERIS e NAVARRO, 2008), isso seria desastroso se não fosse o aumento da síntese de enzimas antioxidantes como superóxido dismutase (SOD) (HIGUCHI et al., 1985; LEEUWENBURGH et al., 1997), catalase (CAT) (QUINTANILHA, 1984; OH-ISHI et al., 1997) e glutathiona peroxidase (GPX) (JI, 1995; JI et al., 1998) que também são induzidas pelo treinamento físico e que constitui-se em uma adaptação metabólica capaz de proteger células e tecidos do estresse oxidativo imposto pelo próprio exercício físico. Assim, o exercício físico gera uma adaptação do sistema antioxidante, com aumento da atividade das enzimas de regulação proporcionando um aumento da resistência contra o estresse e conseqüentemente redução do dano oxidativo (DI WANG et al., 2018; LEEUWENBURGH et al. 1997; PATTEN et al., 2015; POWERS et al. 1994).

Em um estudo de isquemia focal em ratos, o exercício de natação forçado iniciado após a isquemia (20 min/dia, 5 dias/semana), suprimiu dano oxidativo lipídico (malondialdeído) e aumentou atividade superóxido dismutase no hipocampo do hemisfério isquêmico (SONG et al., 1998). Em outro estudo de isquemia global, os roedores que fizeram exercício em esteira, pós-isquemia, apresentaram uma regulação favorável de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs), um marcador de dano oxidativo lipídico, dentro do hipocampo (CECHETTI et al., 2012). Independentemente do tipo de atividade física ou do paradigma do exercício físico, percebe-se efeitos benéficos. Quanto ao estresse oxidativo parece que está relacionado mais à intensidade e duração do exercício que a modalidade do mesmo (CECHETTI et al., 2012; SONG et al., 1998).

Além dos efeitos do exercício físico sobre vários sistemas orgânicos, especialmente o nervoso e o cardiovascular, alguns autores sugerem uma correlação entre o aumento da capacidade aeróbica e melhoria das funções cognitivas (ARIDA et al., 2011; KRAMER et al., 1999; LAURIN et al., 2001). Segundo Gómez-Pinilla (2008) esse efeito benéfico se justifica pelas alterações hormonais, liberação de neurotransmissores e ativação de receptores específicos em resposta ao exercício físico.

As pesquisas têm evidenciado nas duas últimas décadas que os efeitos do exercício no cérebro não se traduzem somente em aumento regional do suprimento de sangue (COLTMAN, BERCHTOLD et al., 2007) aumentando a demanda energética em várias regiões encefálicas

como hipocampo, córtex motor e estriado (VISSING et al., 1996), mas também ativa circuitos neurais específicos, modificando vias de sinalização e o impacto da ação de moléculas especializadas (VAYNMAN e GOMEZ-PINILLA, 2005).

O exercício físico apresenta efeito modulatório que varia de acordo com o tipo e paradigma imposto. Vários estudos demonstram a influência do exercício físico sobre a plasticidade sináptica pela capacidade de indução da expressão gênica associada à sinaptogênese, suporte estrutural e transdução de sinal. Aumenta a expressão de fatores de crescimento como fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) (BERCHTOLD et al., 2005; BRANDT et al., 2010; KE et al., 2011), fator de crescimento do nervo (NGF) (NEEPER et al., 1996; WONG et al., 2003), fator neurotrófico derivado da glia (GDNF) (SMITH e ZIGMOND, 2003) entre outros. O aumento da expressão desses fatores de crescimento modula vias apoptóticas inibindo a morte celular, estimulam o crescimento e gênese de novas células. O exercício físico demonstra também efeito modulatório sobre os níveis de citocinas endógenas (ANG e GOMEZ-PINILLA, 2007). A sobre-expressão de citocinas pró-inflamatórias (fator de necrose tumoral - TNF $\alpha$ , interleucina 1a - IL-1a, interleucina 1b - IL-1b, interleucina 6 - IL6) no encéfalo resulta na patogênese de desordens neurotóxicas e neurodegenerativas (CHENNAOUI et al., 2008).

Outro mecanismo neuroprotetor do exercício físico envolve a modulação do estado oxidativo, embora exista um paradoxo em relação à formação de radicais livres, prejudiciais à função celular (CECHETTI et al., 2008) alguns trabalhos demonstram que o exercício físico pode causar uma adaptação do sistema antioxidante, aumentando a atividade de enzimas de regulação proporcionando aumento da resistência contra o estresse e conseqüentemente redução do dano oxidativo (ANG E GOMEZ-PINILLA, 2007; CHENNAOUI et al., 2012).

As pesquisas em modelos animais ao lançar mão de um paradigma de exercício físico, tentam a simulação das condições de estresse observado em humanos, com objetivo de melhor avaliar ou acompanhar as alterações sistêmicas, celulares e moleculares decorrentes do treinamento físico. Dentre esses paradigmas utiliza-se o exercício forçado e o voluntário. Entre os tipos forçados os mais usados são a corrida em esteira rolante e a natação. O paradigma de exercício voluntário utiliza uma roda de correr colocada no ambiente do animal, que pode utilizá-la livremente (ANG e GOMEZ-PINILLA, 2007). A vantagem da roda de correr defendida por alguns estudos, está no fato de que seus resultados podem ser aplicados a condições humanas quando o indivíduo escolhe quanto e quando correr. Entretanto, não pode ser facilmente quantificado e padronizado quanto à frequência, velocidade, duração e

intensidade, como ocorre com o paradigma forçado. O exercício forçado além de facilitar a medição e padronização de suas variáveis, tem proximidade com os protocolos utilizados em terapias de reabilitação humanas (ANG e GOMEZ- PINILLA, 2007).

Dishman e colaboradores (2006), sugerem que cuidados devem ser tomados com paradigmas de exercícios forçados para que não haja equívocos em relação ao estresse gerado por essas modalidades e o possível mascaramento de seus resultados. Estudos de corrida em esteira e natação tem confundido o estresse normal imposto pelo exercício, com o estresse emocional da repressão, tornando assim difícil a distinção entre os efeitos de estresse geral dos efeitos isolados do exercício. Dependendo da modalidade deve-se ter cuidado, no caso do uso da esteira, com a intensidade de estímulos de choque na esteira rolante, e o período de treinamento, como treinos durante ciclo de luz (sono) dos roedores. Apesar do estresse de repressão citado, investigações demonstram entre outros fatores, uma melhora da função cognitiva com a utilização do treino em esteira, como aumento da plasticidade hipocampal, melhora do aprendizado espacial e não espacial (O'CALLAGHAN et al., 2007), e melhora do dano hipocampal após acidente vascular cerebral (SHAMSAEI, et al., 2017).

II JUSTIFICATIVA

A green arrow pointing to the right, containing the text "II JUSTIFICATIVA". The arrow is filled with a light green color and has a black outline. The text is in a bold, black, serif font.

## 2 JUSTIFICATIVA

O beber episódico pesado ou *binge drinking*, é o padrão de consumo de álcool mais utilizado entre os adolescentes e adultos jovens. Correspondente ao consumo de fim de semana, esse padrão de uso do EtOH pode gerar dependência e implicações neurológicas futuras. O cérebro adolescente, em desenvolvimento, é vulnerável aos prejuízos induzidos pelo álcool e uma das áreas mais afetadas é o hipocampo, responsável pelas funções cognitivas mnemônicas.

Pelo exposto, é justificável avaliar os efeitos do exercício físico sobre a intoxicação alcoólica em modelo *binge drinking* sobre os parâmetros de memória e aprendizagem via estresse oxidativo.



## III OBJETIVOS

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

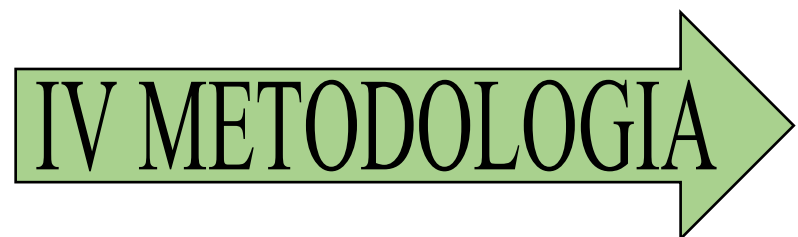
Investigar os efeitos do treinamento físico de moderada intensidade sobre os parâmetros cognitivos e bioquímicos de ratos expostos cronicamente ao EtOH, de forma intensa e episódica (*binge drinking*), da adolescência ao início da fase adulta.

#### 3.2 Objetivos Específicos

Avaliar os efeitos do exercício físico e do consumo de EtOH em padrão *binge drinking* por toda a adolescência até o início da fase adulta em ratos machos, sobre:

- ▶ O balanço bioquímico oxidativo sanguíneo e tecidual dos diferentes grupos experimentais tratados cronicamente com EtOH;
- ▶ Parâmetros oxidativos plasmáticos referentes a níveis de capacidade antioxidante total (TEAC), peroxidação lipídica (LPO) através das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs) e glutatona;
- ▶ Parâmetros oxidativos hipocâmpais referentes a níveis de capacidade antioxidante total (TEAC), glutatona, peroxidação lipídica (LPO) através do malondialdeído (MDA) e óxido nítrico;
- ▶ Alterações em processos cognitivos de aprendizagem e memória de curta duração através do teste de reconhecimento de objeto;
- ▶ Alterações em processos cognitivos de aprendizagem e memória espacial na tarefa de labirinto aquático.

# IV METODOLOGIA



## **4 METODOLOGIA**

### **4.1 Animais Experimentais**

Foram utilizados oitenta (80) ratos albinos da espécie *Rattus norvegicus*, linhagem *Wistar*, machos, com massa corpórea entre 60-80g, com trinta (30) dias de vida fornecidos pelo biotério de criação da Universidade Federal do Pará para o biotério de experimentação. Os animais foram alojados em gaiolas-viveiros de plástico, com dimensões de 30cm x 20cm x 12cm, divididos em grupos de quatro (4) animais por caixa para evitar o estresse pelo isolamento. Durante o período de alojamento, os animais foram alimentados com ração balanceada e água. Permaneceram em temperatura de 25°C, em ciclo escuro/claro de 12 horas (06:00 – 18:00). Esta pesquisa foi submetida ao Comitê de Ética em Pesquisa com Animais de Experimentação da Universidade Federal do Pará, recebendo parecer CEPAE – UFPA 227- 141 (Anexo) e seguindo o Guia NIH para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório (NRC, 2011).

### **4.2 Grupos experimentais**

A amostra foi dividida nos seguintes grupos experimentais, sendo 20 animais por grupo:

GRUPO 1: animais sedentários tratados com água destilada (Controle);

GRUPO 2: animais treinados e tratados com água destilada (Treinado);

GRUPO 3: animais sedentários e tratados com EtOH;

GRUPO 4: animais treinados e tratados com EtOH (Treinado + EtOH).

### **4.3 Tratamento com Etanol**

Foi administrado por via oral (gavagem) através de cânula orogástrica (Insight, Brasil), água destilada (H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>) ou EtOH (Nuclear, Brasil) na dose de 3g/kg/dia (20 p/v) (LAUING et al. 2008; LINDTNER et al. 2013) durante três dias consecutivos na semana, após o último treino da semana (Fig.3). A pesagem dos animais foi realizada semanalmente para o ajuste da dose. No quinto dia de treinamento de cada semana, a administração de EtOH ou água destilada foi feita apenas após o último treinamento do dia. Dessa forma, os animais passaram por doze sessões de binge ao longo de todo o experimento (COUNCIL, 2011).

Os cálculos de preparo para a dose (3 g/kg/dia) e solução (20 p/v) do EtOH, foram realizados conforme descrição abaixo. Para isto, foi considerado:

• Densidade do EtOH: 0,79 g/mL • Pureza do EtOH: 99,5%

$$1) \quad 0,79 \text{ g/mL} \text{ ----- } 99,5\%$$

$$X \text{ ----- } 20\%$$

$$X = 0,16 \text{ g/mL}$$

$$2) \quad 1\text{mL} \text{ ----- } 0,16 \text{ g}$$

$$X \text{ ----- } 3 \text{ g}$$

$$X = 18,75 \text{ mL}$$

$$3) \quad 18,75 \text{ mL (=3 g)} \text{ ----- } 1000 \text{ g}$$

$$X \text{ ----- } 100 \text{ g}$$

$$X = 1,8 \text{ mL}$$

$$4) \quad 100\text{g} \text{ ----- } 1,8 \text{ mL}$$

$$P \text{ (g)} \text{ ----- } X$$

$$X = 1,8 \times P / 100, \text{ onde } P = \text{peso do animal em gramas}$$

#### 4.4 Treinamento Físico

O programa de treinamento físico foi realizado em esteira rolante (Insight LTDA), durante quatro semanas consecutivas por trinta minutos cada sessão de treino (ARIDA et al., 2007). As sessões de corrida foram realizadas em uma esteira motorizada adaptada para roedores com 10cm de largura, 50cm de comprimento e faixas separadas por paredes de acrílico. Os animais do grupo exercício físico passaram por um período de familiarização à esteira durante três dias a uma velocidade de 8m/min com 0° grau de inclinação. Para fornecer uma medida de treinabilidade que avaliou o desempenho dos animais na esteira rolante, utilizamos uma escala de 1 a 5 preconizada por Dishman e colaboradores (1988) onde:

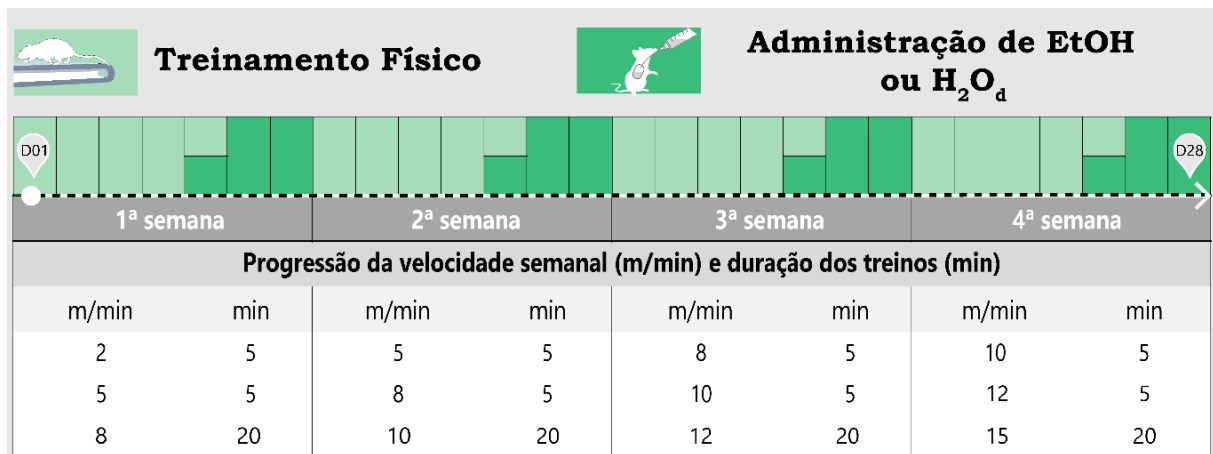
1. O animal se recusa a correr;
2. Corrida sem constância (corre e para ou corre em direção errada);
3. Corrida regular;
4. Corrida boa (ocasionalmente corre na parte de trás da esteira);
5. Corrida excelente (corre permanentemente na parte da frente da esteira).

Os animais com classificação igual ou superior a 3 foram incluídos no grupo de treinamento físico. Os animais descartados não foram incluídos no grupo controle. Este

procedimento foi utilizado para excluir possíveis diferenças nos níveis de estresse entre os animais (ARIDA, et al., 2007).

O programa de treinamento aeróbico consistiu de vinte sessões em esteira rolante, cinco dias por semana com intensidade do exercício (60% VO<sub>2</sub> max) de acordo com os parâmetros prévios utilizados por um estudo anterior de Arida e colaboradores (1999). Cada sessão de treinamento iniciou com um aquecimento de dez minutos em velocidades mais baixas do programa semanal. O tempo e a velocidade da corrida foram aumentados gradativamente durante os dias subsequentes.

Oito horas após o último treino realizamos a indução de toxicidade alcoólica via gavagem orogástrica. A figura 3 mostra o resumo do programa de treinamento e o tratamento via gavagem.



**Figura 3.** Cronograma experimental do protocolo de treinamento físico em esteira e administração de etanol (EtOH) ou água destilada (H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>) por gavagem intragástrica desde o dia 1 (D01) no dia 28 (D28). O protocolo de treinamento físico foi adaptado de Arida et al. (2007)

#### 4.5 Testes comportamentais

Ao final do período de treinamento e tratamento com EtOH ou H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>, os animais foram transferidos para a sala de ensaios comportamentais, os testes só foram iniciados após sessenta minutos de aclimação e habituação ao ambiente de realização dos ensaios. Todos os experimentos comportamentais foram realizados em sala própria, com atenuação dos níveis de ruído e baixa intensidade de iluminação.

Os testes foram realizados após a última administração de EtOH /H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>, e foram selecionados dez (10) animais por grupo. A concentração sanguínea de EtOH (administrado por gavagem) em ratos, possui um declínio gradual e dura em torno de 450 minutos para ser

eliminado do organismo (LIVY et al., 2003). Dessa forma, os testes foram realizados sete horas e trinta minutos após a última administração de EtOH/H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>, não excedendo o horário de 18 horas a fim de não interferir no ciclo circadiano do animal, não participando dessa forma das demais etapas metodológicas para que evitássemos interferências.

#### 4.5.1 Reconhecimento de Objeto

Esse teste foi escolhido por ser realizado em apenas um dia, evitando assim crises de abstinência pela não administração do EtOH, e, conseqüentemente, interferências nos resultados. Esta tarefa investiga a emotividade e a capacidade de memória do animal. O aparato para esse teste consiste em uma arena de madeira medindo 100 x 100 x 30cm (mesma do campo aberto) e analisado através do software Any-maze<sup>TM</sup> versão 4.99 (Stoelting Co., USA).

O teste de reconhecimento de objeto baseia-se no princípio de que, em um ambiente familiar, os roedores de laboratório mostram uma atração instintiva para a novidade, ou preferência por um novo objeto, não familiar (HUGHES, 2007). Esta preferência foi utilizada como um indicativo de memória em relação ao objeto familiar. O procedimento realizado foi adaptado de Pires e colaboradores (2009) o qual consiste de 3 fases: uma fase de habituação, uma fase de treino e uma fase de teste. A fase de habituação foi considerada o momento em que o animal explorou livremente o aparato, sem objetos, por 5 minutos. As fases de treino e de teste duraram 3 minutos cada e tiveram intervalo de 30 minutos entre elas a fim de avaliar a memória de curta duração. Após 30 minutos da fase de habituação, previamente à fase de treino foram fixados dois objetos idênticos em formato de cubo (C1 e C2) em cantos opostos da arena, a 10 cm distantes das paredes e aproximadamente 70cm afastados um do outro. Antecipadamente à fase de teste, uma cópia idêntica do objeto familiarizado (C3) e um objeto novo (X) foram dispostas na arena nos mesmos locais anteriormente ocupados pelos objetos C1 e C2 da fase de treino. O novo objeto selecionado, com diferença estrutural dos cubos, em forma de “X” (X) foi utilizado para a fase de teste. Todos os objetos foram construídos com blocos de plástico Lego (São Paulo, SP, Brasil).

Cada animal foi posicionado delicadamente no centro do aparato nas decorrentes fases e os objetos foram contrabalançados em cada sessão a fim de excluir qualquer preferência por algum canto do aparato. Depois de transcorridos 3 minutos em cada sessão, o animal foi retirado do aparato e devolvido para sua caixa de moradia. No final de cada procedimento, o aparato de madeira foi limpo com papel toalha e álcool 10% para evitar reconhecimento de odor.

Contabilizou-se o tempo despendido de investigação pelos animais em cada objeto registrado a partir de uma câmera fixada sobre o aparato e contabilizado com auxílio do sistema de monitoramento de vídeo ANY-maze™ versão 4.99 (Stoelting Co., USA). A exploração do objeto foi definida como a cabeça do animal voltada para o objeto a uma distância igual ou inferior a 4 cm (adaptado de ENNACEUR; DELACOUR, 1988). As análises foram realizadas considerando o tempo de exploração total gasto nos dois objetos na fase de treino (C1 + C2) e o índice de reconhecimento o qual foi definido pela diferença no tempo de exploração entre o novo objeto e o familiar divididos pelo tempo total gasto de exploração entre os mesmos objetos nas fases de teste  $(X - C3) / (X + C3)$ , ver figura 4.

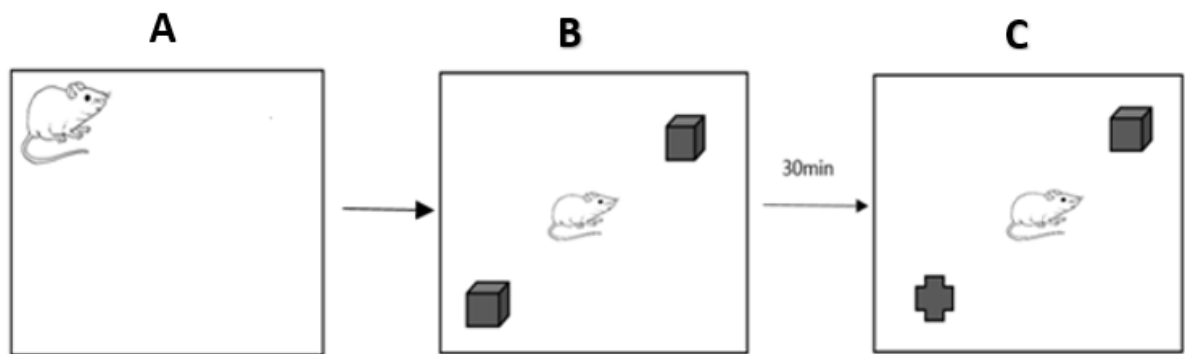


Figura 4. Ilustração do teste de reconhecimento de objeto. Painel A ilustra a fase de habituação, o painel B ilustra a fase de treino com os dois cubos idênticos, e C a fase de teste com o objeto na forma de cruz e outra na forma cubo. Adaptado de Pires et al., 2009.

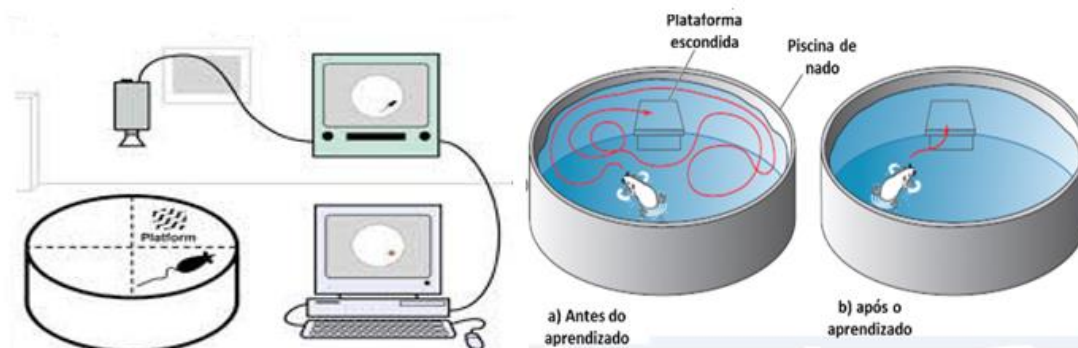
#### 4.5.2 Labirinto Aquático de *Morris*

O labirinto aquático consiste de um tanque circular (1,7m de diâmetro e 80 cm de altura) baseado no modelo proposto por Morris e colaboradores (1982), localizado no interior de uma sala com várias pistas visuais fixadas nas paredes. O tanque foi preenchido com água até a altura de 60cm, sendo a água misturada com corante escuro, para torná-la turva, e mantida à temperatura constante ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ). Foram estabelecidas quatro posições de partida (Norte, Sul, Leste e Oeste) que dividiram a superfície do labirinto em quatro quadrantes (Nordeste, Noroeste, Sudeste e Sudoeste). A plataforma de acrílico transparente (10 x 10 cm) ficava submersa um centímetro da superfície da água.

Foi utilizada a versão memória espacial de referência, cujo protocolo experimental consistiu em quatro sessões de treino e duas sessões de teste, conforme descrito por Prediger (2008). A primeira sessão de teste (memória de curto prazo) foi realizada 1h após o treinamento. Durante o treinamento os animais foram colocados para nadar até encontrarem a plataforma,



em um período máximo de 60s. Caso o animal não encontrasse a plataforma nesse intervalo de tempo, o mesmo era conduzido manualmente até a mesma, onde permanecia por 10s e recebera uma pontuação de latência de 60s. Após os 10s sobre a plataforma, o animal foi retirado do labirinto e colocado em uma caixa acrílica por 20s, sendo então posicionado no ponto de partida seguinte. O tempo (latência) necessário para o animal encontrar a plataforma foi registrado. Este procedimento foi realizado quatro vezes durante a sessão de treino, onde os animais foram liberados para nadar de pontos de partida diferentes de forma pseudo-aleatória, sendo que nesta etapa a plataforma permaneceu na mesma posição (quadrante Sudeste). Na sessão de teste, realizada 1h após o treino, a plataforma foi removida do tanque e os animais foram colocados para nadar (a partir da posição Norte) por 60s, durante os quais foi quantificado o tempo (latência) para os ratos encontrarem o quadrante e o tempo despendido (duração) no quadrante onde a plataforma encontrava-se na sessão de treino. Na sessão de teste foi avaliada a percentagem de tempo no quadrante correto, o tempo de latência para o animal localizar o quadrante da plataforma e a velocidade de nado (m/s). Após 24h foi realizado o teste para aferição da memória de longo prazo, da mesma forma como foi avaliada a memória de curto prazo (OLTON e PAPAS, 1978; PREDIGER, 2008).



**Figura 5.** Teste do labirinto aquático de Morris Fonte: Bear et al. (1996)

#### 4.6 Ensaios de Avaliação do Balanço Oxidativo Sanguíneo e Tecidual

Nossa análise bioquímica contou com outra leva de ratos que não a utilizada para análise comportamental. Dessa maneira evitamos a exposição de nossos animais ao estresse de manipulação. Vinte e quatro horas após a última gavagem, procedemos à avaliação bioquímica sanguínea e tecidual de dez (10) animais de cada grupo. Foram devidamente anestesiados, dissecados através de uma toracotomia para abordagem cardíaca e punção intraventricular e atrial com seringa luer, aspirando em torno de 3 mL de sangue.

Após coleta sanguínea, as amostras de sangue total (n= 5 animais por grupo) foram colocadas em tubo a vácuo K3/EDTA de 4 mL (LABOR IMPORTS) para evitar a coagulação e armazenadas sob refrigeração (-20°C). Outra parte das amostras (n= 5 animais por grupo) foram dispostas em tubos sem anticoagulante, logo depois, postas em centrifugação a baixa velocidade de 1400 rpm por 10 minutos para retirada do soro sanguíneo, estocadas em eppendorf de 2,5mL e acondicionadas sob refrigeração ( $\pm 0^{\circ}\text{C}$ ). O soro foi obtido por centrifugação por 10min a  $1400 \times g$  e armazenado a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Após a punção sanguínea procedeu-se imediatamente a craniotomia e remoção do hipocampo. O tecido extraído foi lavado em soro fisiológico e submetido a congelamento com nitrogênio líquido, sendo posteriormente armazenado em  $-80^{\circ}\text{C}$ . Para as análises, as amostras foram descongeladas e suspensas em Tris (HCl 20mM), pH 7,4, a  $4^{\circ}\text{C}$ , por desagregação sônica (concentração aproximada de 1g/mL). O lisado foi armazenado a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o momento do processamento.

#### 4.6.1 Capacidade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC)

Para análises dos níveis TEAC, utilizamos o método descrito por Rufino et al. (2007) e adaptado do estudo de Miranda et al. (2018). Resumidamente, o ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolino) -6-sulfônico (ABTS; 7mM) foi incubado adicionando persulfato de potássio (2,45 mM) à temperatura ambiente durante 16h para produzir o radical ABTS<sup>+</sup>. A solução de trabalho foi preparada a partir do radical ABTS<sup>+</sup> em solução salina básica de fosfato (PBS) (pH 7,2) até a absorvância de  $0,7 \pm 0,02$  a 734nm. Subsequentemente, 35  $\mu\text{L}$  desta solução ou padrões de trolox (curva padrão) foram adicionados a 2970 $\mu\text{L}$  de solução ABTS e a absorvância foi adquirida após 5 minutos. As absorvâncias foram medidas em triplicado e calculadas segundo uma curva padrão com concentrações padrão de trolox (R. RE et al., 1999). A capacidade antioxidante total foi expressa em  $\mu\text{mol/L}$ .

#### 4.6.2 Glutationa peroxidase (GPX) e glutatona redutase (GR)

O ensaio de GPx foi baseado no método descrito por Flohe e Gunzler (1984). A atividade enzimática foi calculada usando o coeficiente de extinção de  $6,2 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Uma unidade da enzima é definida como a quantidade de enzima que catalisa a oxidação de 1 $\mu\text{mol}$  de NADPH por minuto. Os brancos são feitos na ausência do extrato enzimático. A atividade da GR foi ensaiada seguindo a oxidação de 0,1-0,25 mM NADPH por 1-5 mM GSSG em 1 mL de tampão fosfato de potássio 50mM, pH 7,2, com 0,5mM EDTA contendo 50 $\mu\text{L}$  de extrato proteico (RAMOS-VASCONCELOS et al., 2005). A oxidação do NADPH foi monitorada a

340 nm. Dois brancos foram ensaiados: um na ausência de GSSG e outro na ausência de extrato. Utilizamos também a metodologia descrita por Smith et al. (1985) que utiliza DTNB [5,5'-ditiobis(2-nitrobenzóico)].

#### 4.6.3 Determinação do malondialdeído (MDA)

Determinação do MDA é um método que avalia peroxidação lipídica e atua como um indicador de estresse oxidativo. O método baseia-se na reação do MDA, entre outras substâncias, com a reação substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) realizadas de acordo com um método proposto (C. C. DA SILVEIRA et al., 2016). Em cada tubo de ensaio, 10nM de TBA (Sigma-Aldrich T5500) e 0,5mL do soro da amostra foi adicionado. Em seguida, os tubos foram colocados em banho-maria pH 2,5 e a uma temperatura elevada ( $94^{\circ}\text{C} \times 60\text{min}$ ) para formar o complexo MDA-TBA de cor rosa. Após este procedimento, as amostras foram resfriadas em água corrente e álcool butílico foi adicionado a cada amostra para obter a máxima extração de MDA na fase orgânica. Finalmente, os tubos foram centrifugados a 2500rpm por dez minutos e o sobrenadante foi coletado e lido pelo método da espectrofotometria (comprimento de onda de 535nm). Os resultados foram expressos como percentagens de grupos controles.

#### 4.6.4 Ensaio da concentração de nitrito (NO)

Para quantificação de nitrito, utilizamos um protocolo (H. I. KOHN e M. LIVERSEDGE, 1994) que consiste em usar uma alíquota de homogenato bruto foi centrifugado a 21.000 g durante 20 min a  $4^{\circ}\text{C}$  e o sobrenadante para analisar os níveis de nitrito. Resumidamente, as amostras foram incubadas à temperatura ambiente durante 20 min com reagente de Griess (0,1% naftil-etilenodiamina e 1% sulfanilamida em ácido fosfórico a 5% - 1: 1). A absorbância foi medida a 550 nm por um espectrofotômetro e comparada às soluções padrão de nitrito de sódio.

#### 4.6.5 Concentração de Proteína

Utilizamos o método proposto por Bradford (1976), onde 100 $\mu\text{L}$  da amostra de tecido foram misturados com 100 $\mu\text{L}$  do reagente de Bradford em vortex. A concentração de proteína foi medida espectrofotometricamente ( $\lambda=595\text{nm}$ ) e os resultados expressos como miligrama de proteínas. Soluções de concentrações conhecidas de albumina bovina foram utilizadas como padrão. Os resultados foram utilizados para uma correção do MDA e concentrações de nitrito.

#### 4.6.6 Determinação da peroxidação lipídica (LPO)

A peroxidação lipídica foi estimada como os níveis de malondialdeído (MDA) e 4-hidroxiálquenos (4HDA), conforme detalhado anteriormente por Esterbauer e Cheeseman (1990). Como previamente descrito em outro estudo (L. O. BITTENCOURT, et al., 2017), uma alíquota do sobrenadante foi processada conforme descrito pelo kit Bioxytech LPO-568 (Cayman Chemical). Este kit é um reagente cromogênico que reage com o MDA a 45°C. A medição da absorbância nos espectrofotômetros foi realizada a 586m de comprimento de onda.

A figura 6 demonstra o delineamento experimental adotado no estudo, o esquema dos procedimentos foi descrito e ilustrado na seguinte ordem; descrição da amostra (Painel 1), ensaios comportamentais (Painel 2) e bioquímicos (Painel 3).

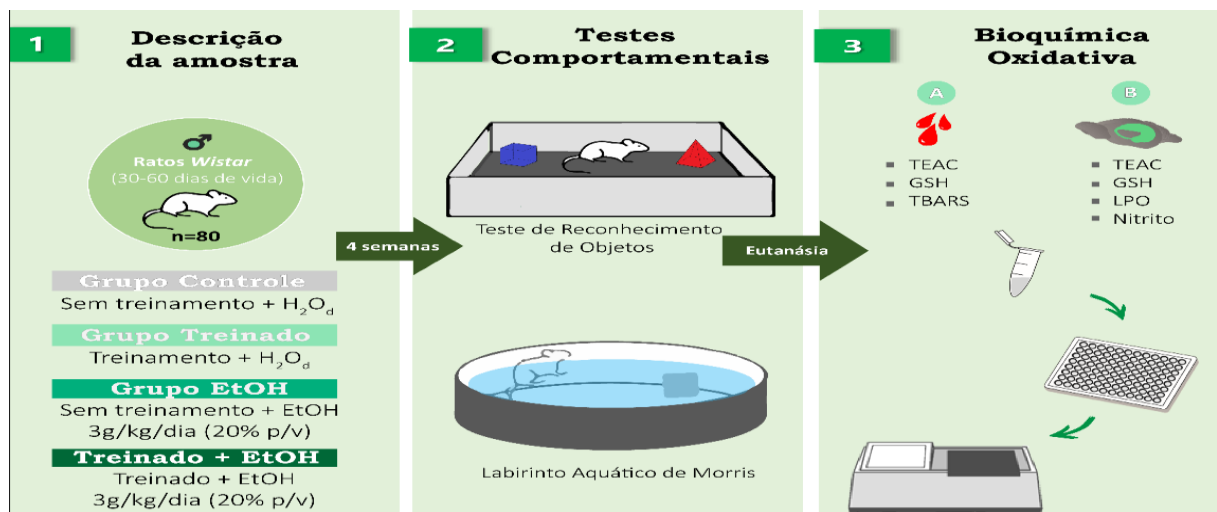


Figura 6. Descrição da amostra e delineamento experimental. (1) Caracterização da amostra e divisão dos grupos experimentais de treinamento físico em esteira e etanol (EtOH) ou água destilada (H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>); após quatro semanas (28 dias), realização de (2) ensaios comportamentais: Teste de reconhecimento de objetos e labirinto aquático de Morris (MWM); a partir da eutanásia, (3A) coleta de plasma sanguíneo para avaliação oxidativa.

#### 4.7 Análise Estatística

Após a coleta de dados, a distribuição foi testada pelo método de Shapiro-Wilk para verificação da normalidade. As comparações estatísticas entre os grupos foram realizadas utilizando ANOVA 1-via e post-hoc de Tukey, exceto para a curva de peso que foi avaliada com ANOVA 2-vias seguido pelo teste post-hoc de Tukey. Foram considerados estatisticamente significantes os valores de  $p < 0.05$ . Todas as análises foram realizadas no software GraphPad Prism 7.0 (San Diego, CA, EUA).

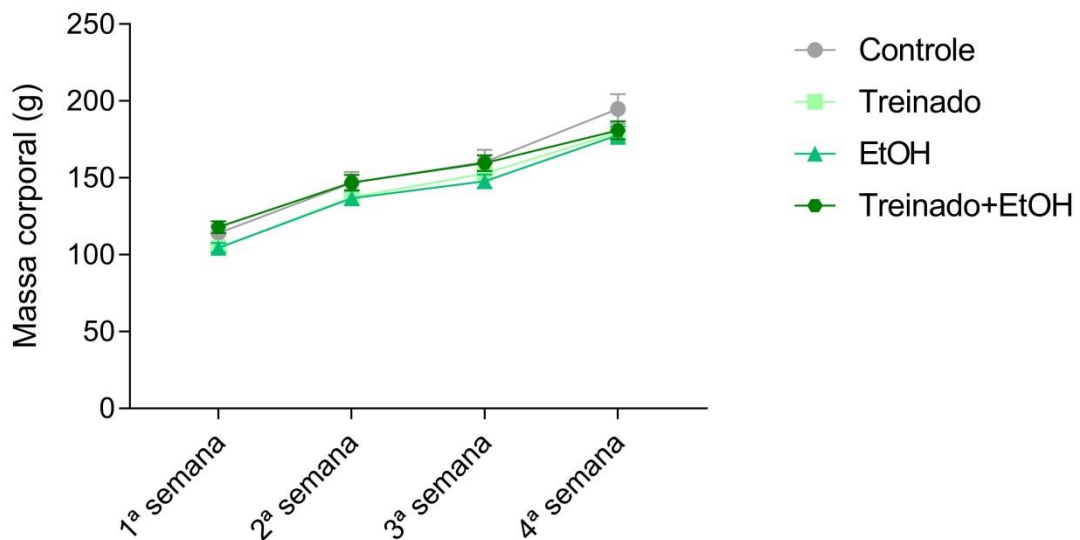
V RESULTADOS



## 5 RESULTADOS

### 5.1 Efeitos de ciclos repetidos de EtOH em padrão binge e treinamento físico em esteira no ganho de peso dos animais.

Ciclos repetidos de treinamento físico em esteira e EtOH tipo binge durante quatro semanas não interferiram no peso dos animais ( $p = 0,937$ ). Ao final do experimento, os animais não apresentaram diferença no peso médio (grupo controle:  $194,9 \pm 9,5$ ; grupo treinado:  $179,5 \pm 4,6$ ; grupo EtOH:  $177,86 \pm 5,59$ ; grupo Treinado + EtOH:  $180,93 \pm 5,85$ ), ver figura 7.

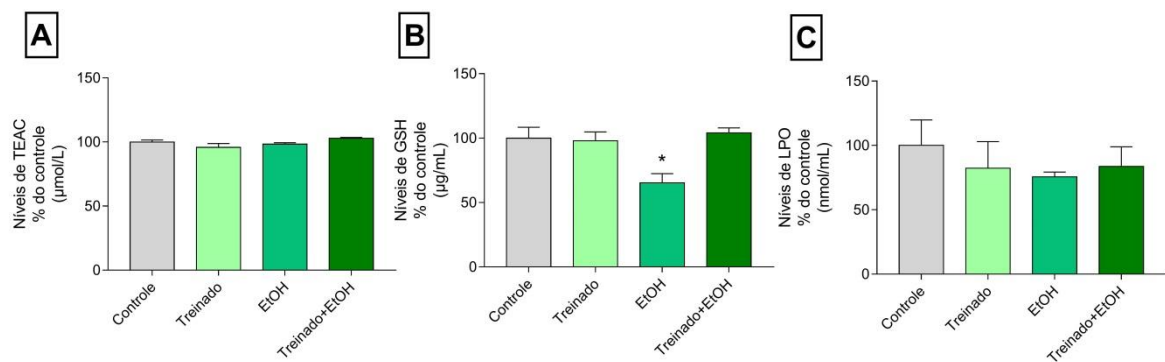


**Figura 7.** Efeitos de quatro ciclos de treinamento físico em esteira e exposição ao etanol tipo binge, durante 28 dias, no ganho de peso corporal (g) de ratos Wistar. Os resultados são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. ANOVA two-way e teste post-hoc de Tukey,  $p > 0,05$ .

### 5.2 O treinamento físico evitou alterações bioquímicas induzidas pela exposição ao EtOH em padrão binge por 4 semanas no plasma de ratos.

Após ciclos repetidos de treinamento físico em esteira e EtOH tipo binge durante quatro semanas, o EtOH não induziu mudanças nos níveis de TEAC (grupo EtOH:  $93,35 \pm 1,05\%$ ; grupo treinado + EtOH:  $102,9 \pm 0,65$ ), quando comparado ao plasma de animais controles e apenas treinados (grupo controle:  $100 \pm 1,57$ ; grupo treinado:  $95,77 \pm 3,01$ ;  $p = 0,076$ , Figura 8A).

No entanto, observou-se diminuição dos níveis de GSH no plasma de ratos da exposição apenas ao EtOH (grupo EtOH:  $65,37 \pm 7,13\%$ ) em relação aos demais grupos (grupo controle:  $100 \pm 8,38\%$ ; grupo treinado:  $97,93 \pm 6,85\%$ ; grupo treinado + EtOH:  $104 \pm 3,87\%$ ;  $p = 0,005$ , Figura 4B), enfatizando que o treinamento físico evitou as alterações induzidas pelo EtOH. Nenhuma diferença significativa foi observada na TBARS entre os grupos investigados (grupo controle:  $100 \pm 19,86\%$ ; grupo treinado:  $82,26 \pm 20,7\%$ ; grupo EtOH:  $75,55 \pm 3,77\%$ ; grupo treinado + EtOH:  $83,74 \pm 15,16\%$ ;  $p = 0,965$ , Figura 8C).



**Figura 8.** Efeitos de quatro ciclos de treinamento físico em esteira e exposição ao etanol *binge-like*, durante 28 dias, sobre o balanço oxidativo no plasma sanguíneo de ratos Wistar. (A) níveis de TEAC; (B) níveis de GSH e (C) LPO. Os resultados são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média da porcentagem de controle. One-way ANOVA e teste post-hoc de Tukey,  $p < 0,05$ . \*Diferença estatística em relação aos demais grupos.

### 5.3 Treinamento físico regular em esteira modulou o equilíbrio bioquímico oxidativo no hipocampo de ratos expostos a quatro ciclos de consumo excessivo de álcool.

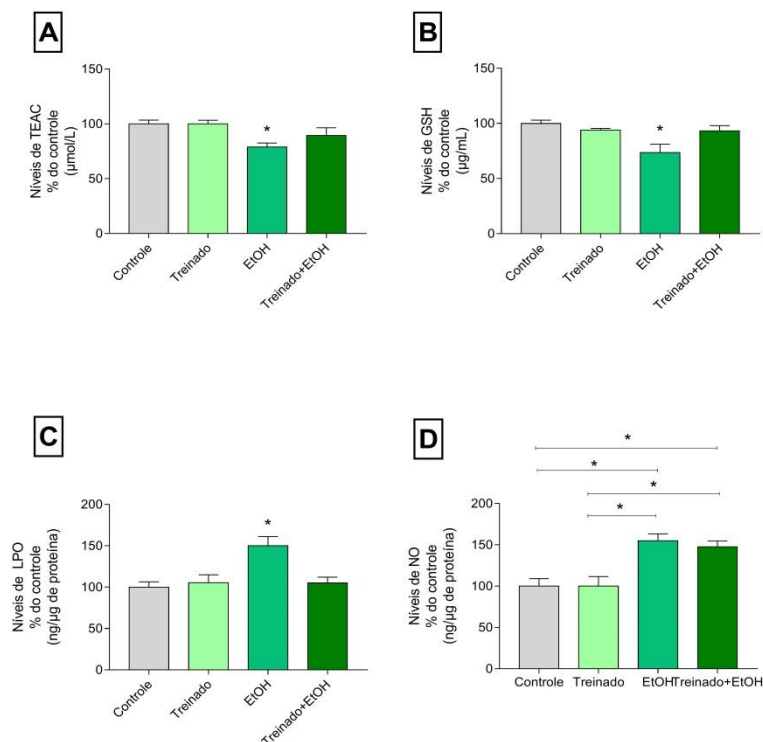
A exposição a ciclos repetidos de EtOH em um padrão binge também alterou os parâmetros oxidativos no hipocampo de ratos. O EtOH reduziu os níveis de TEAC (grupo EtOH:  $78,88 \pm 3,67\%$ ; Figura 9A) no hipocampo de ratos em comparação aos animais controle ( $100 \pm 3,41\%$ ;  $p = 0,016$ ). Esse desequilíbrio da bioquímica oxidativa foi evitado pelo treinamento físico (grupo Treinado + EtOH:  $89,38 \pm 7,09\%$ ;  $p = 0,385$ , Figura 9A).

A exposição ao EtOH também modificou parâmetros oxidativos relacionados aos níveis de GSH (grupo EtOH:  $73,58 \pm 7,54\%$ ) quando comparado ao grupo controle ( $100 \pm 2,87\%$ ;  $p$

= 0,009), o que não foi observado nos animais expostos ao treinamento físico. (Grupo treinado:  $93,95 \pm 1,44\%$ ; grupo Treinado + EtOH:  $93,24 \pm 4,7\%$ ;  $p > 0,05$ , Figura 8B).

Foi observado aumento da concentração de MDA no hipocampo de animais expostos a EtOH (grupo EtOH:  $150 \pm 11,09\%$ ) em relação aos demais grupos (grupo controle:  $100 \pm 6,33\%$ ; grupo treinado:  $105,4 \pm 9,44$ ; grupo treinado + EtOH :  $105 \pm 7,03$ ;  $p = 0,003$ , Figura 9C).

Além disso, o grupo EtOH apresentou alta concentração de NO (grupo EtOH:  $155 \pm 8,24\%$ ) em relação aos grupos sem administração de EtOH (grupo controle:  $100 \pm 9,04\%$ ; grupo treinado:  $100 \pm 11,55$ ;  $p < 0,05$ ). Em contraste, não houve diferença estatística em relação aos animais treinados e expostos ao EtOH (grupo Treinado + EtOH:  $147,5 \pm 7,08\%$ ;  $p = 0,958$ , Figura 9D).



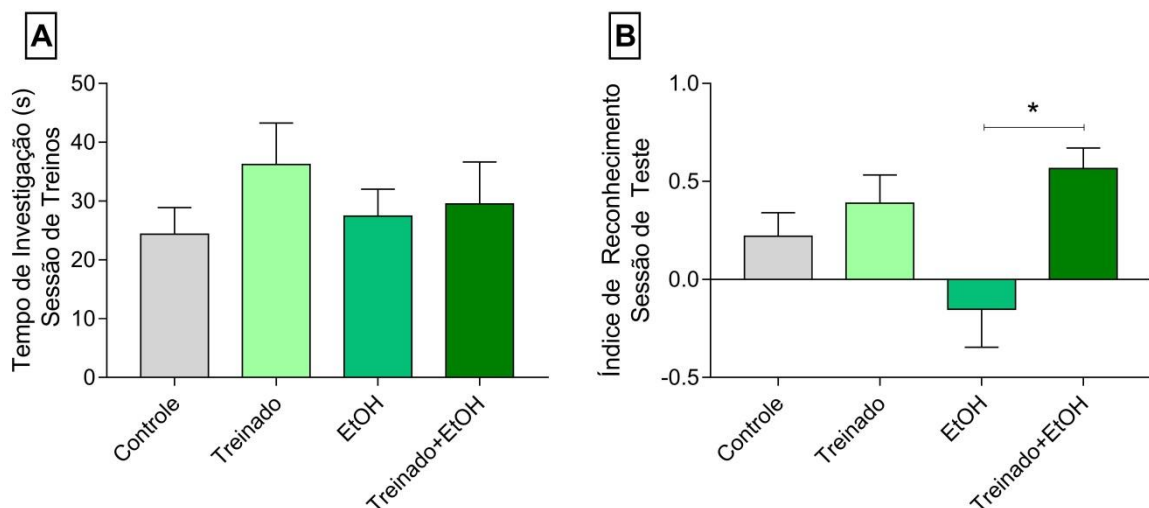
**Figura 9.** Efeitos de quatro ciclos de treinamento físico em esteira e exposição ao etanol tipo binge, durante 28 dias, no balanço oxidativo no hipocampo de ratos Wistar. (A) níveis de TEAC; (B) níveis de GSH; (C) níveis de LPO e (D) percentual de nitrito por miligrama de proteína em relação ao grupo controle. Os resultados são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. One-way ANOVA e teste post-hoc de Tukey,  $p < 0,05$ . \* Diferença estatística em relação aos outros grupos ou entre grupos indicados.



#### 5.4 O treinamento físico minimizou os déficits de memória de ratos expostos a ciclos repetidos de EtOH em padrão binge.

Ciclos repetidos de EtOH tipo binge durante quatro semanas em ratos, induziram prejuízo em sua memória de trabalho, memória espacial de longo prazo e capacidade de aprendizagem, como observado nos testes de reconhecimento de objetos e de labirinto aquático de Morris.

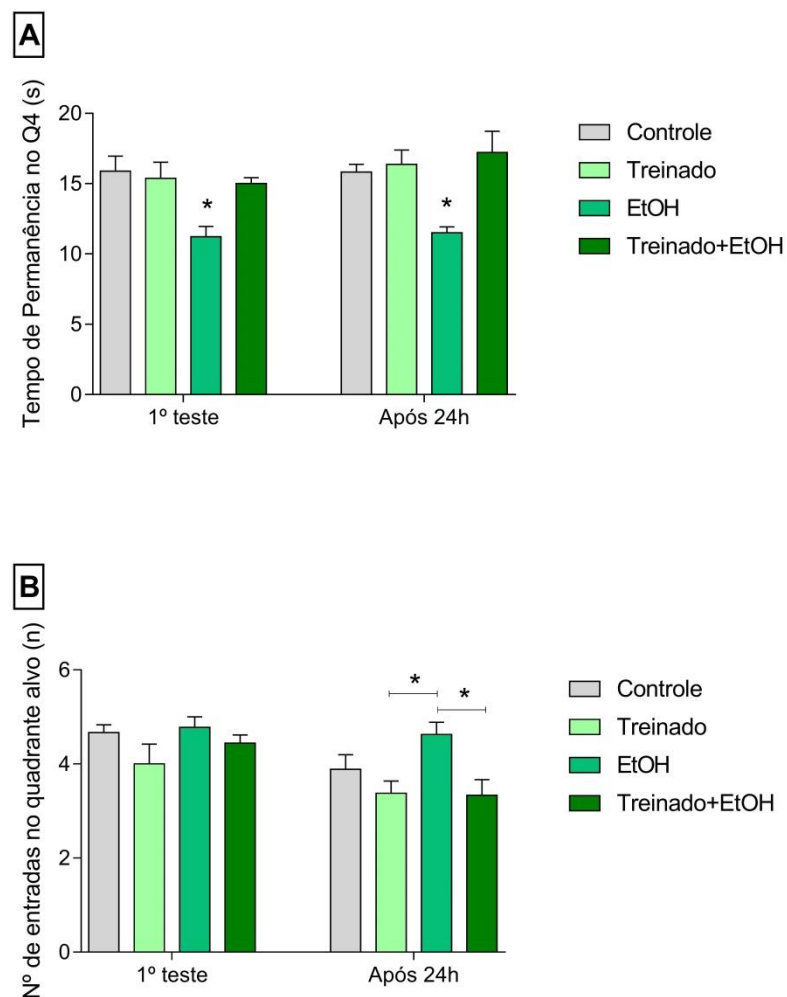
No teste de reconhecimento de objeto, animais treinados e expostos ao EtOH (grupo Treinado + EtOH:  $0,56 \pm 0,1$ ) obtiveram alto índice de reconhecimento quando comparados aos animais que receberam apenas EtOH (grupo EtOH:  $-0,15 \pm 0,19$ ;  $p = 0,005$ , Figura 10), revelando a redução da memória de curto prazo de ratos expostos ao EtOH e sem treinamento físico.




**Figura 10.** Efeitos de quatro ciclos de treinamento físico em esteira e exposição ao etanol tipo binge, durante 28 dias, na memória de trabalho de ratos Wistar. Os resultados são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média de (A) tempo (s) de investigação na sessão de treino e (B) índice de reconhecimento na sessão de teste. One-way ANOVA e teste post-hoc de Tukey,  $p < 0,05$ . \* Diferença estatística em relação aos outros grupos ou entre grupos indicados.

Quando a aprendizagem e a memória foram avaliadas pelo labirinto aquático de Morris (Figura 11), nossos dados demonstraram que o treinamento físico evitou as alterações induzidas pela administração de EtOH. Isso foi observado no primeiro teste (grupo controle:  $15,89 \pm 1,06$ ; grupo treinado:  $15,38 \pm 1,14$ ; grupo EtOH:  $11,22 \pm 0,74$ ; grupo treinado + EtOH:  $15 \pm 0,42$ ;  $p = 0,002$ ) e em teste após vinte e quatro horas ( grupo controle:  $15,83 \pm 0,54$ , grupo treinado:  $16,38 \pm 1,01$ , grupo EtOH:  $11,5 \pm 0,42$ , grupo treinado + EtOH:  $17,2 \pm 1,53$ ,  $p = 0,002$ ) no

tempo gasto no quadrante alvo (Figura 11A). Com relação ao número de entrada no quadrante alvo (Figura 11 B), não houve diferença significativa no primeiro teste entre os grupos (grupo controle:  $4,66 \pm 0,16$ ; grupo treinado:  $4 \pm 0,42$ ; grupo EtOH:  $4,77 \pm 0,22$ ; treinado + EtOH :  $4,44 \pm 0,17$ ;  $p = 0,182$ ) enquanto no teste após vinte e quatro horas o grupo EtOH apresentou diferença em relação ao grupo treinado e treinado e exposto a EtOH (grupo treinado:  $3,37 \pm 0,26$ ; grupo EtOH:  $4,6 \pm 0,26$ ; grupo treinado + EtOH:  $3,33 \pm 0,33$ ;  $p < 0,05$ ), mas não em relação ao grupo controle (grupo controle:  $3,88 \pm 0,3$ ;  $p = 0,319$ ).



**Figura11.** Efeitos de quatro ciclos de treinamento físico em esteira e exposição ao etanol tipo binge, durante 28 dias, na memória espacial de longo prazo e na capacidade de aprendizagem de ratos Wistar. Os resultados são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média de (A) tempo gasto no (s) alvo (s) e (B) número de entrada no alvo. Ambas as medições foram realizadas no primeiro teste e teste após vinte e quatro horas. One-way ANOVA e teste post-hoc de Tukey,  $p < 0,05$ . \* Diferença estatística em relação aos outros grupos ou entre grupos indicados.



# VI DISCUSSÃO

## 6 DISCUSSÃO

Considerando os impactos na saúde que o consumo de EtOH pode causar e a constante necessidade de investigar novas ferramentas terapêuticas que melhorem seus danos, este trabalho traz dados importantes sobre como o exercício físico afeta positivamente as funções cognitivas que são profundamente afetadas pelo consumo de EtOH, mesmo em padrão de consumo excessivo. Este estudo revelou que o exercício físico está associado à restauração dos níveis de GSH no sangue de ratos expostos ao EtOH. Além disso, esta ferramenta terapêutica não-farmacológica também está associada à restauração dos níveis de TEAC e GSH no hipocampo de ratos expostos ao EtOH, e também à redução dos níveis de LPO no estado basal, comparável a animais não expostos. E seguindo essa perspectiva dos impactos do padrão de consumo excessivo do EtOH, estamos mostrando que o exercício físico melhora substancialmente as funções cognitivas do hipocampo, como memória e aprendizado.

A exposição ao EtOH chamada de binge drinking, é a prática de consumir grandes quantidades de álcool em uma única sessão, seguida por período de abstinência. O termo “*binge drinking*” pode ser substituído por beber episódico pesado, por se tratar de uma forma intervalar que se assemelha ao consumo de fim de semana e por provocar uma concentração de álcool no sangue de 0,8g/L ou mais, caracterizando a forma pesada de beber. Esta dosagem é equivalente a cinco ou mais doses para homens, ou quatro ou mais doses para mulheres, em um período de duas horas. O modelo de intoxicação alcoólica em binge utilizado nesse trabalho, reproduz o padrão de dano oxidativo encefálico visto em humanos que bebem em binge. No entanto, o grau de severidade do dano cerebral pode depender de algumas variáveis, como o tempo de exposição juntamente com sexo e idade (FERNANDES et al., 2018; JI et al., 2018; MAYNARD e LEASURE, 2013; TEXEIRA, et al., 2014).

Este estudo utilizou modelo de exposição ao álcool em padrão binge, devido levantamentos epidemiológicos relatarem ser o mais utilizado entre os adolescentes e adultos jovens. Como o cérebro adolescente se encontra em processo de desenvolvimento, torna-se ainda mais relevante a abordagem científica desse padrão de uso por pelo menos dois motivos, devido a vulnerabilidade do cérebro em maturação, e por se tratar de uma realidade crescente no cotidiano de jovens, o uso de uma droga psicotrópica absolutamente prejudicial para promover mudança comportamental e prejuízo das funções cognitivas em curto e em longo prazo. Mais, o uso de forma crônica predispõe à dependência. Vale ressaltar que naturalmente

o indivíduo adolescente busca por sensações e ignora riscos e sob efeito do álcool torna-se ainda mais vulnerável a vários aspectos insalubres.

A adolescência é um período de transição gradual entre a infância e a idade adulta. Compreende o período entre os doze e dezoito anos em humanos e de 28 a 42 dias pós-natal em roedores (SPEAR, 2000). Durante esse período, as alterações hormonais, comportamentais e neurais são muito semelhantes entre as espécies de mamíferos, justificando desse modo o emprego de modelos animais para contribuição da pesquisa científica nessa fase do desenvolvimento humano. O encéfalo adolescente em transição, apresenta diferenças anatômicas e neuroquímicas em relação ao adulto. Vale ressaltar que a obtenção da maturidade sexual chamada de puberdade, faz parte dessas transições que caracterizam a adolescência (CREWS et al., 2007; SPEAR, 2000). Justifica-se, então, o aspecto do desprezo ao risco e busca de novidades inerentes aos adolescentes humanos.

A exposição ao EtOH está associada a vários distúrbios neurológicos, que podem ser induzidos em vários estágios do desenvolvimento, desde a exposição pré-natal, caracterizando Síndrome Alcoólica Fetal, e efeitos em indivíduos pós-natais, como baixo desempenho motor e declínio cognitivo (ORNOY, 2010; TEIXEIRA et al. 2014; OLIVEIRA et al., 2015; MATTHEWS et al., 2018). Este último é comumente associado a capacidades visuo-espaciais, funções executivas e memória episódica (BERNARDIN et al., 2014; LE BERRE et al., 2017). Seguindo esse componente cognitivo, o hipocampo desempenha uma função fundamental nesse processo, uma vez que, anatomicamente, está relacionado a outras estruturas profundamente associadas aos processos de memória (SQUIRE, 1992). Além disso, o hipocampo é um centro integrador de projeções dos córtices perirrinal, parahipocampal e entorrinal (LAVENEX & AMARAL, 2000), que são incluídas nos caminhos de comunicação da memória espacial (parte das memórias declarativas) (EICHEBAUM 1999; 2000; 2001). E, embora a literatura apresente achados controversos do papel do hipocampo na tarefa de reconhecimento de objetos, alguns estudos apontam que esta estrutura está principalmente associada à memória visual e a memória de reconhecimento, reforçando que o hipocampo é também, uma estrutura associativa necessária para um processo cognitivo eficiente (CLARK et al., 2000; PRUSKY et al., 2004; BROADBENT, 2004; BARKER & WARBURTON, 2015; BARKER, 2011; LEGER, 2013; STANLEY, 2012; BARKER, 2011). Desta forma, para nossa avaliação comportamental, elegemos esses dois paradigmas para investigar falha do hipocampo após exposição a EtOH: memória espacial e memória de reconhecimento.

O teste de reconhecimento de objeto tem como base, a apresentação dos roedores a objetos familiares e novos. Instintivamente eles passam maior parte do tempo explorando o objeto novo. Esta preferência é utilizada como um indicativo de memória em relação ao objeto familiar (RUTTEN, et al., 2008). Nossos resultados nesse teste foram marcadamente significativos, uma vez que ratos expostos ao EtOH tiveram déficits de memória acentuados em comparação aos controles e aos expostos treinados. O teste do labirinto aquático de Morris, especialmente indicado para medir aprendizagem espacial e processos mnemônicos dependentes do hipocampo (OLTON e PAPAS, 1978; SHARMA et al., 2010), demonstrou-nos que os ratos expostos ao etanol tiveram déficit de memória espacial de longa duração.

Este estudo mostrou que a intoxicação alcoólica no padrão binge por três dias consecutivos por semana (durante quatro semanas) gerou estresse oxidativo no hipocampo, mas não no sangue. O estresse hipocampal, por outro lado, promoveu o comprometimento das memórias de curto e longo prazos. Além disso, pela primeira vez, foi demonstrado que o exercício físico forçado, em esteira, concomitantemente com a intoxicação por EtOH, minimizou os efeitos deletérios oxidativos e comportamentais gerados pela exposição ao EtOH em ratos adultos jovens.

Vários estudos têm destacado a forte associação entre estresse oxidativo e declínio cognitivo, especialmente avaliando agentes anti e pró-oxidativos no sangue de pacientes com funções cognitivas comprometidas (BERR 2000; SCHRANG 2013; REVEL 2015; HAIJAR 2018). E, curiosamente, esses estudos apontaram que níveis reduzidos de glutathione peroxidase ou glutathione no sangue podem ser um forte biomarcador para o declínio cognitivo (BERR 2000; REVEL 2015; HAIJAR 2018). Nesta perspectiva, hipotetizamos que a redução dos níveis de GSH encontrados no sangue de ratos expostos ao EtOH pode exercer uma forte associação com o déficit hipocampal encontrado neste estudo. Apesar dos repetidos ciclos de intoxicação em binge, a concentração sérica de TBARS não foi significativa entre os grupos, descartando a possibilidade de o exercício físico ter um papel prejudicial na dinâmica oxidativa. Ainda, em trabalho recente (FERNANDES, et al., 2018), os autores observaram que fêmeas adolescentes Wistar tratadas com EtOH em padrão binge, apresentaram efeitos cumulativos sobre o dano oxidativo no córtex motor e fígado, também não detectável na periferia, parecendo que as variáveis sexo e idade não interferiram nesse cenário.

Quando no sangue, as moléculas de etanol são transportadas rapidamente para todos os tecidos que têm células com alta concentração de água como cérebro, fígado, coração e rins

(ZAKHARI, 2006). A vulnerabilidade do sistema nervoso central para os efeitos do etanol e a exposição durante o desenvolvimento cerebral, pode causar anormalidades irreversíveis nas estruturas e funções cerebrais (CANTACORPS et al., 2018; GUERRI e PASCUAL, 2010). A avaliação da peroxidação lipídica no sistema nervoso central tem importância relevante tendo em vista o fato de o cérebro ser particularmente vulnerável aos radicais livres, devido ao alto consumo de oxigênio, alto conteúdo em substratos facilmente oxidáveis, contrastando com a baixa atividade de enzimas antioxidantes.

O SNC tem um metabolismo celular elevado, que demanda alto consumo de oxigênio e, naturalmente, resulta na produção de EROS, o que requer um eficiente funcionamento do sistema antioxidante (PATEL M, 2016). O consumo de etanol estimula o desequilíbrio oxidativo, causando a oxidação de LPO, DNA e proteínas, o que é suficiente para promover a disfunção mitocondrial e subsequente dano neuronal. Por outro lado, as EROs estão associadas à neuroinflamação, que também contribui para a alteração das organelas, porém, a desintoxicação, reparo e adaptação são respostas esperadas durante um estado inflamatório, que em situação de déficit, pode levar à oxidação dos componentes celulares mencionados acima (BAIERLE et al., 2015; PATEL M, 2016), que podem aumentar a morte celular e resultar em prejuízos cognitivos, como memória e aprendizagem (VETRENO E CREWS, 2015) também observados neste estudo.

Além disso, os prejuízos comportamentais observados nesta investigação foram acompanhados por mudanças marcantes no status redox, visualizadas no aumento da LPO e redução dos níveis de GSH e TEAC no hipocampo. Assim, os resultados sugerem que o estresse oxidativo induzido pelo EtOH exerce seus efeitos patológicos no hipocampo e funções cognitivas, e a redução dos níveis de LPO, mas não no teor de nitrito, pode ser mediada pelo exercício físico.

Não notamos mudanças significativas no peso corporal de nossos ratos entre os grupos e por toda a extensão do experimento. Trabalhos anteriores relataram que o EtOH induziu diminuição de peso corporal. Essa diminuição parece ser dependente da dose e quanto maior a dose do EtOH menor o peso de ratos (KUMAR et al., 2006; TEXEIRA, et al., 2014). Essa diminuição se fez significativa a partir da dose de 1,2g de etanol por quilograma de peso corporal durante quatro semanas (KUMAR et al., 2006). Nossa amostra manteve-se com peso estável pelo mesmo período de exposição na dose de 0,8g/kg. O exercício físico também não interferiu em ganho ou perda de peso em nossa amostra.

O protocolo de exercício físico utilizado (ARIDA et al 2007), foi absolutamente inócuo em relação à dinâmica oxidativa, uma vez que nossa análise bioquímica no plasma mostra que os níveis de marcador de LPO não foram significativos quando comparamos o grupo treinado com o controle e o decréscimo de os níveis de GSH foram vistos apenas no grupo intoxicado não treinado. Em trabalho relativamente recente (SVENSSON et al., 2016), os autores também utilizaram um protocolo de exercício físico forçado, em esteira rolante, e relatam que o exercício aumentou o nível de cortisona, e correlacionaram com aumento do dano cerebral isquêmico, apesar de não terem feito avaliação de dano oxidativo em tecido sanguíneo. Esse efeito díspar ao nosso, pode ser explicado pela diferença entre os protocolos de exercício. Diariamente os animais eram mantidos por dez minutos iniciais em velocidades mais baixas e o restante vinte minutos na velocidade mais alta do programa semanal (ver figura 1). Protocolos de exercício forçado em esteira rolante que padronizam aumento gradativo da velocidade, permitem a manutenção do equilíbrio entre pró e antioxidantes como confirmado por nossos resultados.

Devemos considerar o paradoxo em relação aos efeitos da prática do exercício físico, pois o mesmo provoca aumento no consumo de oxigênio e, conseqüentemente a geração de EROs. Entretanto, o aumento da síntese de enzimas antioxidantes que também é induzido pelo treinamento físico, constitui uma adaptação metabólica capaz de proteger células e tecidos do estresse oxidativo imposto pelo próprio exercício físico (SCHNEIDER et al., 2005; SHEN et al., 2013) como mencionado anteriormente. A elevação da LPO no hipocampo de ratos intoxicados com EtOH e a elevação da TEAC em ratos intoxicados, porém treinados, traduz essa adaptação metabólica e nos permite sugerir que a melhora cognitiva que observamos foi devido a esse status bioquímico oxidativo.

Desta forma, acreditamos veementemente que um dos mecanismos pelos quais o EtOH exerce seus efeitos deletérios sobre o SNC, especialmente nas funções cognitivas, é pelo estresse oxidativo. Mas, o mais interessante é que a intensidade moderada e gradual do exercício físico restaura as taxas normais de agentes antioxidantes e pró-oxidantes no sangue e/ou no hipocampo.





## VII CONCLUSÕES

## 7 CONCLUSÕES

Demonstramos que EtOH em padrão de consumo binge induz desequilíbrio bioquímico oxidativo hipocampal, a partir da diminuição dos níveis de TEAC e maior produção de LPO, o que pode desencadear danos comportamentais em ratos. Entretanto, não houve alterações dos níveis de TBARs sanguíneo entre os grupos estudados.

Uma das principais contribuições do presente estudo foi mostrar pela primeira vez que os danos promovidos no hipocampo de ratos pelo consumo excessivo de EtOH, podem ser minimizados pelo exercício em esteira, de intensidade moderada e gradual. Portanto, o protocolo de exercício físico usado, evitou o desequilíbrio oxidativo e minimizou os danos teciduais e funcionais no hipocampo causados pelo EtOH.



## REFERÊNCIAS

- ALOIA, J. F.; P. RASULO, L. J.; DEFTOS, A. V.; YEH J. K. Exercise-induced hypercalcemia and the calciotropic hormones. **J. Lab. Clin. Med.** 106, 229-232, 1985.
- ANG, E.; GOMEZ-PINILLA. Potential Therapeutic Effects of Exercise to the Brain. **Current Medicinal Chemistry.** 14(24), 2564–2571, 2007.
- ANTONY, J. C. Consumo nocivo de álcool: dados epidemiológicos mundiais. In: ANDRADE. Arthur Guerra de; ANTONY, James C. **Álcool e suas consequências: uma abordagem multiconceitual.** 1ª Ed. São Paulo: Minha Editora, 1, p 36, 2009.
- ANTONY, J. C.; VAN ETTEN, M. L. Epidemiology and its Rubrics: A Bellack & M. Hersen (Eds.). (Vol. 1) **Comprehensive Clinical Psychology.** Oxford, UK: Elsevier Science Publications, 355-390, 1998.
- APA. AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-IV-TR).** 4ª Ed. Washington, EUA, 2000.
- ARAIN, M.; HAQUE, M.; JOHAL, L.; MATHUR, P.; NEL, W.; RAIS, A.; SANDHU, R.; SHARMA, S. Maturation of the adolescent brain. **Neuropsychiatric Disease and Treatment.** 9: 449–461, 2013.
- ARIDA, R. M.; SCORZA, F. A.; GOMES, S. S.; CYSNEIROS, R. M.; CAVALHEIRO, E. A.: Exercise paradigms to study brain injury recovery in rodents. **Am J Phys Med Rehabil,** v. 90, p. 452–465, 2011.
- ARIDA, R. M.; SCORZA, F. A.; LACERDA, A.F.S.; SILVA, S.G. Physical training in developing rats does not influence the kindling development in the adult life. **Physiology & Behavior,** v. 90, n. 4, p. 629-633, 2007.
- ARIDA, R. M.; VIEIRA, A. J. CAVALHEIRO, E. A. The course of untreated seizures in the pilocarpine model of epilepsy. **Epilepsy,** v. 34, p. 99-107, 1999.
- ARTOLA, A.; SINGER, W. Long-term potentiation and NMDA receptors in rat visual **cortex.** *Nature,* v. 303, p. 649-652, 1987.
- ARUOMA, O. I. Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidants. *Food and Chemical Toxicology,* 32(7), 671–683, 1994.
- BADAWY, A. B. Alcohol, aggression and serotonin: Metabolic aspects. **Alcohol,** [S.I], n. 33, p. 66-72, 1998.
- BANNERMAN, D. M.; RAWLINS, J. N.; MCHUGH, S. B; DEACON, R. M.; YEE, B. K.; BAST, T.; ZHANG, W. N; POTHUIZEN, H. H.; FELDON, J. Regional dissociations within the hippocampus-memory and anxiety. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews,** v. 28, p. 273–283, 2004.
- BARKER, G. R. I.; WARBURTON, E. C. Object-in-place associative recognition memory depends on glutamate receptor neurotransmission within two defined hippocampal-cortical

circuits: a critical role for AMPA and NMDA receptors in the hippocampus, perirhinal, and prefrontal cortices. **Cerebral cortex** (New York, N.Y. : 1991), vol. 25, no. 2, pp. 472-481, 2015.

BARKER, G. R.; WARBURTON, E. C. When is the hippocampus involved in recognition memory? **J Neurosci**, vol. 31, no. 29, pp. 10721-31, 2011.

BEAR, M.F. A synaptic basis for memory storage in the cerebral cortex. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 26; (24): 13453–13459, 1993.

BERCHTOLD, N.C.; CHINN, G.; CHOU, M.; KESSLAK, J.P.; COTMAN, C.W. Exercise primes a molecular memory for brain-derived neurotrophic factor protein induction in the rat hippocampus. **Neuroscience**. vol 133, no. 3, pp. 853-61, 2005.

BERNARDIN, F.; MAHEUT-BOSSER, A.; PAILLE, F. Cognitive impairments in alcohol-dependent subjects. **Frontiers in psychiatry**, vol. 5, pp. 78-78, 2014.

BHAVE, S. V.; SNELL, L. D.; TABAKOFF, B.; HOFFMAN, P.L. Mechanism of ethanol inhibition of NMDA receptor function in primary cultures of cerebral cortical cell. **Alcohol Clinical Experiment Research**, [S.l], n. 20, p. 934-941, 1996.

BITTENCOURT, L. O.; PUTY, B; CHARONE, S.; ARAGAO, W. A. B.;FARIAS-JUNIOR, P. M.; SILVA, M. C. F.; CRESPO-LOPEZ, M. E.; LEITE, A. L.; BUZALAF, M. A. R.; LIMA, R. R. Oxidative Biochemistry Disbalance and Changes on Proteomic Profile in Salivary Glands of Rats Induced by Chronic Exposure to Methylmercury. **Oxid Med Cell Longev**, vol. 2017, pp. 5653291, 2017.

BLISS, T. V. P.; LØMO, T. Long-lasting Potentiation of Synaptic Transmission in the Dentate Area of the Unanaesthetized Rabbit Following Stimulation of the Perforant Path. In: CRAVER, C. F. **The Making of a Memory Mechanism**. V. 36, p. 153-195, 2003.

BOUTROS, N.; SEMENOVA, S.; MARKOU, A. Adolescent intermittent ethanol exposure diminishes anhedonia during ethanol withdrawal in adulthood. **Eur Neuropsychopharmacol**. 24:856-64, 2014.

BOVERIS, A.; NAVARRO, A. Brain mitochondrial dysfunction in age. **IUBMB Life**, v. 20, p. 308-314, 2008.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**.72:248-54, 1976.

BRANDT M.D.; MAASS. A.; KEMPERMANN, G.; STORCH, A. Physical exercise increases Notch activity, proliferation and cell cycle exit of type-3 progenitor cells in adult hippocampal neurogenesis. **Eur J Neurosci**, vol. 32, no. 8, pp. 1256-64, 2010.

BROADBENT, J.; GRAHAME, N. J.; CUNNINGHAM, C. L. Haloperidol prevents ethanol-stimulated locomotor activity but fails to block sensitization. **Psychopharmacology**, [S.l], n.120, p. 475-482, 1995.

BROADBENT, N. J.; SQUIRE, L. R.; CLARK, R. E. Spatial memory, recognition memory, and the hippocampus. **Proc Natl Acad Sci U S A**, vol. 101, no. 40, pp. 14515, 2004.

- CALDWELL, L. C.; SCHWEINSBURG, A. D.; NAGEL, B. J.; BARLETT, V. C.; BROWN, S. A.; TAPERT, S. F. Gender and adolescent alcohol use disorders on BOLD (blood oxygen level dependent) response to spatial working memory. **Alcohol Alcohol.**, v. 40, p. 194-200, 2005.
- CECCARELI, I. DELA SETA, D.FIOREZZANI, P. Estrogenic chemical at puberty change ER $\alpha$  in the hypothalamus of male and female rats. **Neurotoxicol. Teratol.**, v. 29, p. 108-115, 2007.
- CECHETTI, F.; WORM, P. V.; ELSNER, V. R.; SANCHES, E.; BEN, J. SIQUEIRA, I. R.; NETTO, C. A. Forced treadmill exercise prevents oxidative stress and memory deficits following chronic cerebral hypoperfusion in the rat. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 97 (1), p. 90-96, 2012.
- CENTERWALL, B. S.; CRIQUI, M. H. Prevention of the Wernicke-Korsakoff syndrome: A cost-benefit analysis. **New England Journal Medicine**, [S.l.], n. 299, p. 285-289, 1978.
- CENTRO DE INFORMAÇÕES SOBRE SAÚDE E ÁLCOOL (CISA). **Metabolismo do álcool**. Disponível em: <<http://www.cisa.org.br/artigo/5536/metabolismo-alcool.php>>. Acesso em: 12 de outubro 2018.
- CHENNAOUI, M. Effects of physical training on IL-1 $\beta$ , IL-6 and IL-1 $\alpha$  concentrations in various brain areas of the rat. **Eur Cytokine Netw** [S.l.], v. 19 (1), p. 8-14, 2008.
- CLARK, R. E.; ZOLA, S. M.; SQUIRE, L. R. Impaired Recognition Memory in Rats after Damage to the Hippocampus. **The Journal of Neuroscience**, vol. 20, no. 23, pp. 8853, 2000.
- CLASEN, L. S.; TOGA, A. W. RAPORPOT, J. L.; THOMPSON, P. M. Dynamic mapping of human cortical development during childhood through early adulthood. **PNAS**, V. 101 (21), 2004.
- COLLINGRIDGE, G. L.; KEHL, SJ; MCLENNAN, H. Excitatory amino acids in synaptic transmission in the Schaffer collateral-commissural pathway of the rat hippocampus. **J Physiol.**, 334: 33-46, 1983.
- COMHAIR, S.A.A.; ERZURUM, S.C. Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases. American Journal of Physiology. **Lung Cellular and Molecular Physiology**, v.283, p. L246-L255, 2002.
- CORDEIRO, V.; FILHO, B.; CAMPOS, W. Prevalência de consumo de álcool e tabaco entre adolescentes brasileiros: revisão sistemática. **Revista Saúde Pública**, v. 46, n. 5, p. 901-917, 2012.
- COTMAN, C. W.; BERCHTOLD, N. C. Exercise: a behaviour intervention to enhance brain health and plasticity. **Trends Neurosci** [S.l.], v. 25 (6), p. 295- 301, 2002.
- COTMAN, C. W.; BERCHTOLD, N. C.; CHRISTIE, LA. Exercise builds brain health: key roles of growth factor cascades and inflammation. **Trends Neurosci** [S.l.], v. 30 (9), p. 464-72, 2007.
- CREWS, F. T.; BOETTIGER, C. A. Impulsivity, frontal lobes and risk for addiction. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, 93(3), 237-247, 2009.

- CREWS, F.; HE, J.; HODGE, C. Adolescent cortical development: A critical period of vulnerability for addiction. **Pharmacol Biochem Behav**, 86: 189–199, 2007.
- DANDOLT, N. C. Glutamate uptake. **Prog. Neurobiol.**, v. 65, p. 1-105, 2001.
- DE BELLIS, M. D.; NARASIMHAN, A.; THATCHER, D. L.; KESHAVAN, M. S.; SOLOFF, P.; CLARK, D. B. Prefrontal cortex, thalamus, and cerebellar volumes in adolescents and young adults with adolescent onset alcohol use disorders and comorbid mental disorders. **Alcohol Clin. Exp.**, v. 29, p. 1590-1600, 2005.
- DISHMAN, R. K.; ARMSTRONG, R.B.; DELP, M.D.; GRAHAM, R.E.; DUNN, A.L. Open-field behavior is not related to treadmill performance in exercising rats. **Physiol Behav**, v. 43, n. 5, p. 541-546, 1988.
- DISHMAN, R. K.; BERTHOUD, H.R.; BOOTH, F.W.; COTMAN, C.W.; EDGERTON, V.R.; FLESHNER, M.R.; GANDEVIA, S.C.; GOMEZ-PINILLA, F.; GREENWOOD, B.N.; HILLMAN, C.H.; KRAMER, A.F.; LEVIN, B.E.; MORAN, T.H.; RUSSO-NEUSTADT, A.A.; SALAMONE, J.D.; VAN HOOMISSEN, J.D.; WADE, C.E.; YORK, D. A.; ZIGMOND, M.J. Neurobiology of exercise. **Obesity** (Silver Spring) [S.I.], v. 14 (3), p. 345-356, 2006.
- DOUGLAS, R. M.; GODDARD, V. Long-term Potentiation of the Perforant Path Granule Cell Synapse in the Rat Hippocampus. In: CRAVER, C. F. **The Making of a Memory Mechanism**. V. 36, p. 153-195, 2003.
- DUMAN, R. S. Neurotrophic factors and regulation of mood: role of exercise, diet and metabolism. **Neurobiol. Aging**, V. 1, P. 88-93, 2005.
- EICHENBAUM, H. A cortical-hippocampal system for declarative memory. **Nat Rev Neurosci**, vol. 1, no. 1, pp. 41-50, 2000.
- EICHENBAUM, H. The hippocampus and declarative memory: cognitive mechanisms and neural codes. **Behav Brain Res**, vol. 127, no. 1-2, pp. 199-207, 2001.
- EICHENBAUM, H.; COHEN, N. J. From conditioning to conscious recollection: Memory systems of the brain. Oxford, UK: **Oxford University Press**, 2001
- ENNAGEUR, A.; DELACOUR, J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. **Behavioral Research**, v. 31, p. 47-59, 1988.
- ESTERBAUER, H.; K. H. CHEESEMAN,. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. **Methods Enzymol**, vol. 186, pp. 407-21, 1990.
- FADA, F.; ROSSET, Z. L. Chronnic ethanol consumption: from neuroadaptation to neurodegeneration. **Progress in Neurobiology**, v. 56 (4), p. 385-431, 1998.
- FANSELOW, M. S.; DONG, H. W. Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? **Neuron**, v. 65, p. 7–19, 2010.
- FARZANA, F.; AHUJA, I. R.; SREEKANTH, V. Non-Pharmacological interventions for enhancing brain plasticity and promoting brain recovery: A review. **Research in Neuroscience**, v. 2 (3), p. 39-49, 2013.

- FARZI M.A., Sadigh-Eteghad S., Ebrahimi K., Talebi M. Exercise Improves Recognition Memory and Acetylcholinesterase Activity in the Beta Amyloid-Induced Rat Model of Alzheimer's Disease. **Ann Neurosci**, vol. 25, pp. 59–63, 2018.
- FERNANDES, L. M. P., LOPES, K. S., SANTANA, L. N. S., FONTES-JUNIO, E. A., RIBEIRO, C. H. M. A., SILVA, M. C. F., MAIA, C. S. F. Repeated Cycles of Binge-Like Ethanol Intake in Adolescent Female Rats Induce Motor Function Impairment and Oxidative Damage in Motor Cortex and Liver, but Not in Blood. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 1–14, 2018.
- FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev Ass Méd Brasil**, 43:61, 1997.
- FLOHE, L.; GUNZLER, W. A. Assays of glutathione peroxidase. **Methods Enzymol**, v. 105, n. p. 114-121, 1984.
- GALDURÓZ, J. C. F.; NOTO, A. R.; NAPPO, S. A.; CARLINI, E. A. **II Levantamento Domiciliar sobre o Uso de Drogas Psicotrópicas: Estudo envolvendo as 108 maiores cidades do país**. São Paulo, 2005.
- GARCIA, L. P. Consumo abusivo de álcool no Brasil: Resultados da Pesquisa Nacional de Saúde 2013. **Epidemiol. Serv. Saúde**, v. 24 (2), p. 227-237, 2015.
- GARCIA-MORENO, M.; CIMADEVILLA, M. Acute and chronic ethanol intake: Effects on spatial and non-spatial memory in rats. **Alcohol**, v. 46, p. 757-762, 2012.
- GIVENS, B.; MCMAHON, K. Ethanol suppresses the induction of long-term potentiation in vivo. **Brain Research**, [S. 1], n. 688, p. 27-33, 1995.
- GOGTAY, N.; GIEDD, J. N; LUSK, L.; HAYASHI, K. M.; GREENSTEIN, D.; VAITUZIS, C. A.; NUGENT, T. F. HERMAN, D. H.; THOMPSON, P. M. Dynamic mapping of human cortical development during childhood through early adulthood. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 101(21), 8174–8179, 2004.
- GOMES DA SILVA, S., SIMÕES, P. S. R., MORTARA, R. A., SCORZA, F. A., CAVALHEIRO, E. A., DA GRAÇA NAFFAH-MAZZACORATTI, M., & ARIDA, R. M. Exercise-induced hippocampal anti-inflammatory response in aged rats. **Journal of Neuroinflammation**, vol 10, no. 1, 2013.
- GÓMEZ-PINILLA, F. Brain foods: the effects of nutrients on brain function. **Nature Reviews Neuroscience**, 9(7), 568–578, 2008.
- GUERRI, C.; PASCUAL, M. Mechanisms involved in the neurotoxic, cognitive, and neurobehavioral effects of alcohol consumption during adolescence. **Alcohol**, v. 44, p. 15-26, 2010.
- GUNZERATH, L.; FADEN, V.; ZAKHARI, S.; WARREN, K. National institute on alcohol abuse and alcoholism report on moderate drinking. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v.28, n. 6, p. 829-47, 2004.



- HALLIWELL, B. Current Status Review: Free radicals, reactive oxygen species and human disease: a critical evaluation with special reference to atherosclerosis. **Br. J. Exp. Path**, 70, 737-757, 1989.
- HALLIWELL, B., GUTTERIDGE JMC. In free radicals in Biology and Medicine, 2nd Ed. **Oxford University Press**, Oxford, UK, 1989.
- HARPER, C.; MATSUMOTO, I. Ethanol and brain damage. **Current Opinion in Pharmacology**, [S.1], n. 5, p. 73-78, 2005.
- HASHIMOTO J. G.; WIREN, K. M. Neurotoxic consequences of chronic alcohol withdrawal: expression profiling reveals importance of gender over withdrawal severity. **Neuropsychopharmacology**, v. 33, p.1084–1096, 2008.
- HENKER, K. A model for memory systems based on processing modes rather than consciousness. **Neuroscience**, v. 11, p. 523-532, 2010.
- HERMAN, J. P.; OSTRANDER, M. M.; MUELLER, N. K.; FIGUEIREDO, H. Limbic system mechanisms of stress regulation: hypothalamo-pituitaryadrenocortical axis. *Prog. Neuropsychopharmacol.* **Biol. Psychiatry**, v. 29, p. 1201–1213, 2005.
- HERZ, R. S. and CUPCHIK, G. C. An experimental characterisation of odour- evoked memories in humans. **Chem. Senses**, v. 17, p. 519-528, 1992.
- HIGUCHI, M.; CARTIER, L.J.; CHEN, M.; HOLLOSZY, J. O. Superoxide dismutase and catalase in skeletal muscle: adaptive response to exercise. **Journal of Gerontology**, v. 3 (40), p. 281-286, 1985.
- HOMMER, D. WW.; MOMENAN, E. K.; RAWLINGS, R. R. Evidence for a gender-related effects of alcoholism on brain volumes. **Am J Psychiatry**, v. 158, p. 198-204, 2001.
- HUESTON, C.M., CRYAN, J.F., NOLAN, Y.M. Adolescent social isolation stress unmasks the combined effects of adolescent exercise and adult inflammation on hippocampal neurogenesis and behavior. **Neuroscience**, vol. 365, pp. 226-236, 2017.
- HUGHES, S. K. Migrating identities: The relational constitution of drug use and addiction. **Sociology of Health & Illness**, v. 29 (5), p. 673-691, 2007.
- ITO, D.; Imai, Y.; Ohsawa, K.; Nakajima, K.; Fukuuchi, Y.; Kohsaka, S. Microglia –Specific localization of a novel calcium binding protein, Iba1. **Brain Res Mol Brain Res**, v.57, p.1-9, 1998.
- IZQUIERDO, I. **Memória**. 2ª Ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.
- IZQUIERDO, I.; MEDINA, J. H. Correlation between the pharmacology of long-term potentiation and the pharmacology of memory. **Neurobiol Learn Mem**, v. 63, p. 19-32, 1995.
- Jl, L.L. Exercise and oxidative stress: role of the cellular antioxidant systems. **Exercise and Sport Science Reviews**, v. 23, p.135–166, 1995.
- Jl, L.L.; STRATMAN, F.; LARDY, H. Antioxidant enzyme systems in rat liver and skeletal muscle. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 263, p. 150– 160, 1988.

JI, Z., YUAN, L., LU, X., DING, H., LUO, J., & KE, Z.J. Binge Alcohol Exposure Causes Neurobehavioral Deficits and GSK3 $\beta$  Activation in the Hippocampus of Adolescent Rats. *Scientific Reports*, vol. 8, no.1, 2018.

KANDEL, E. R.; SCHWARTZ, J. H, JESSEL, T. M. **Fundamentos da neurociência e do comportamento**. Rio de Janeiro: Prentice-Hall do Brasil, 1997.

KANDEL, E. R.; SCHWARTZ, J. H.; JESSELL, T. M.; SIEGELBAUM, S. A.; HUDSPETH, A. J. **Princípios de Neurociências**. 5ª Ed. USA: McGraw-Hill; Artmed, 2014.

KE, Z.; YIP, S. P.; LI, L.; ZHENG, X.X.; TONG, K. Y. The Effects of Voluntary, Involuntary, and Forced Exercises on Brain-Derived Neurotrophic Factor and Motor Function Recovery: A Rat Brain Ischemia Model. *PLoS ONE*, vol. 6, no. 2, pp. 166-43, 2011.

KERR-CORRÊA F.; TUCCI, A. M.; HEGEDUS, A. M.; TRINCA, L. A.; OLIVEIRA, J. B.; FLORIPES, T. M.; KERR, L. R. F. S. Drinking patterns between men and women in two distinct Brazilian communities. *Rev Bras Psiquiatr*, v. 30(3), p. 235–242, 2008.

KERR-CORRÊA, F. Differences in drinking patterns between men and women in Brazil. In: OBOT, I.; ROOM, R. **GENECIS – alcohol, gender and drinking problems: perspectives from low and middle income countries**. 1st Ed. Genebra: OMS, Capítulo. 3, p. 40-68, 2005.

KIM, J. W. Induction of apoptosis and expression of cell cycle regulatory proteins in response to a Phytosphingosine derivate in HaCat human keratinocyte cells. *Molecules and Cells*, v. 21, p. 331-337, 2003.

KIM, J. W.; LEE, D. Y.; LEE, B. C.; JUNG, M. H.; KIM, H.; CHOI, Y. S.; CHOI, I. G. Alcohol and cognition in the elderly: a review. *Psychiatry Investig*, v. 9 (1), p. 8-16, 2012.

KINNULA, V.L.; CAPRO, J.C. Superóxide dismutase in the lung and human lung diseases. *American Journal of Respiratory and Critical Care*, v.167, p.1600-1619, 2003.

KINNULA, V.L.; CRAPO, J.D.; RAIVIO, K.O. Generation and disposal of reactive oxygen metabolites in the lung. *Laboratory Investagation*, v.73, n.1, p.3-19, 1995.

KOCH, O. R., PANI, G., BORRELLO, S., COLAVITTI, R., CRAVERO, A., FARRE, S., & GALEOTTI, T. Oxidative stress and antioxidant defenses in ethanol-induced cell injury. *Molecular Aspects of Medicine*, 25(1-2), 191–198, 2004.

KOHN, H.I.; Liversedge, M. On a new aerobic metabolite whose production by brain is inhibited by apomorphine, emetine, ergotamine, epinephrine, and menadione. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, vol. 82, no. 1994, pp. 292–300, 1994.

KOIKE, H.; SOBUE, G. Alcoholic neuropathy. *Curr Opin Neurol*, v. 19 (5), p. 481-486, 2006.

KRAMER, A. F. HAHN, S.; COHEN, N. J.; BANICH, M. T.; McAULEY, E.; HARRISON, C.R.; CHASON, J.; VAKIL, E.; BARDELL, L.; BOILEAU, R. A.; COLCOMBE, A. Ageing, fitness and neurocognitive function. *Nature* [S.I.], v. 400 (6743), p. 418-419,1999.

KUMAR, D.A.S.; HIRAN, K.R.; SUKHES, M.; VASUDEVAN, D.M. Oxidative stress is the primary event: Effects of ethanol consumption in brain,” *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, vol 22, no. 1, pp. 99-104, 2007.

- LARANJEIRA, R. et al. **I Levantamento nacional sobre os padrões de consumo de álcool na população brasileira**. São Paulo: Uniad e Senad, 76p, 2007.
- LARANJEIRA, R. O consumo de álcool no Brasil, tendências entre 2006 e 2012. II LENAD, **Levantamento nacional de álcool e drogas**. São Paulo, 2013.
- LAURIN, D.; VERREAULT, R.; LINDSAY, J.; MACPHERSON, K.; ROCKWOOD, K. Physical activity and risk of cognitive impairment and dementia in elderly persons. *JAVA Neurology*, v. 58 (3), p. 498-504, 2001.
- LAVENEX, P.; AMARAL, D. G. Hippocampal-neocortical interaction: a hierarchy of associativity. *Hippocampus*, vol. 10, no. 4, pp. 420-30, 2000.
- LE BERRE, A. P.; FAMA, R.; SULLIVAN, E. V. Executive Functions, Memory, and Social Cognitive Deficits and Recovery in Chronic Alcoholism: A Critical Review to Inform Future Research. *Alcohol Clin Exp Res*, vol. 41, no. 8, pp. 1432-1443, 2017.
- LE, A. D.; HARDING, S.; JUZYTSCH, W.; FUNK, D.; SHAHAM, Y. Role of alpha-2 adrenoceptores in stress-induced reinstatement of alcohol seeking and alcohol self-administration in rats. *Psychopharmacology*, [S.l.], n. 179, p. 366-373, 2005.
- LEE, I. M.; PAFFENBARGER, R. S. Physical activity and stroke incidence: the Harvard alumni health study stroke. v. 29, p. 2049-2054, 1998.
- LEEUWENBURGH, C.; HOLLANDER, J.; FIEBIGER, R.; LEICHTWEIS, S.; GRIFFITH, M.; LI, J.J. Adaptations of glutathione antioxidant system to endurance training are tissue and muscle fiber specific. *American Journal of Physiology*, v. 272, p. 363-369, 1997.
- LEGER, M.; QUIEDEVILLE, A.; BOUET, V.; HAELEWYN, B.; BOULOUARD, M.; SCHUMANN-BARD, P.; FRERET, T. Object recognition test in mice. *Nature Protocols*, vol. 8, pp. 2531, 2013.
- LENT, R. **Cem bilhões de neurônios? Conceitos fundamentais da neurociência**. Ed: Atheneu 2ªd, 848p. Rio de Janeiro, 2010.
- LENT, R. **Neurociência da Mente e do Comportamento**. Ed. Guanabara Koogan, 356p. Rio de Janeiro, 2008.
- LIU, S.; SHI, W.; LI, G.; JIN, B.; CHEN, Y.; HU, H.; LIU, L.; XIE, F.; CHEN, K.; YIN, D. Plasma reactive carbonyl species levels and risk of non-alcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol Hepatol*. 2011; 26(6): 1010-5.
- LIVY, D.J.; PARNELL, S.E.; WEST J. R. Blood ethanol concentration profiles: a comparison between rats and mice. *Alcohol*. 2003; 29: 165-171.
- LOECHES, A. S.; GUERRI, C. Molecular and behavioral aspects of the actions of alcohol on the adult and developing brain. *Informa Healthcare*, v. 48 (1) p. 19-47, 2011.
- LOVINGER, D. M. Communication networks in the brain. *Alcohol. Res. Health.*, v. 31 (3), p. 196-224, 2008.

- MAHABIR, S.; LEITZMANN, M. F.; PIETTINEN, P.; NIAKAS, C.; SILYE, G. JAKUS, J.; GOTO, S. The effects of training and detraining on memory, neurotrophins and oxidative stress markers in rain brain. **Neurochem. Int.**, v. 49, p. 387-392, 2006.
- MAREN, S.; BAUDRY, M. Properties and mechanisms of long-term synaptic plasticity in the mammalian brain: relationship to learning and memory. **Neurobiol. Learn. Mem.**, v. 63, p. 1-18, 1995.
- MATTHEWS, D. B.; WATSON, M. R.; JAMES, K.; KASTNER, A.; SCHNEIDER, A.; MITTLEMAN, G. The impact of low to moderate chronic intermittent ethanol exposure on behavioral endpoints in aged, adult and adolescent rats. **Alcohol**, 2018.
- MAYNARD M.; LEASURE L. Exercise Enhances Hippocampal Recovery following Binge Ethanol Exposure. **PLoS ONE**, v. 8 (9), 2013.
- MCGAUGH, J. L.; ROOZENDAAL, L. B. Role of adrenal stress hormones in forming lasting memories in the brain. **Current Opinions on Neurobiology**, v. 12, p. 205-210, 2002.
- MEDINA, K. L.; MCQUEENY, T.; NAGEL, B. J.; HANSON, K. L. SCWEINSBURG, A. D.; TAPERT, S. F. Prefrontal cortex volumes in adolescents with alcohol use disorders: unique gender effects. **Alcohol Clin. Exp.**, v. 32, p. 386-394, 2008.
- MELLENDEZ, R. I; KALIVAS, P. W. Last call for adenisine transporters. **Nature Neuroscience**, [S.l], n. 7, p. 759-796, 2004.
- MIRANDA, G. H.; GOMES, B; BITTENCOURT, L.O.; ARAGÃO, W.; NOGUEIRA, L.; DIONIZIO, A.; BUZALAF, M A.R. MONTEIRO, M. C.; LIMA, R. R. Chronic Exposure To Sodium Fluoride Triggers Oxidative Biochemistry Misbalance In Mice: Effects In Blood Peripheral Circulation. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, vol. 2018, 8 pages, 2018.
- MODELLI, M.; PRATESI, R.; TAUIL P. L. Blood alcohol concentration in fatal traffic accidents in the Federal District, Brazil. **Ver Saúde Pub.**, v. 42 (2), p. 350-352, 2008.
- MORRIS, R. G. M.; GARRUD, P.; RAWLINS, J.N.P.; O'KEEFE, J. Place navenation impaired in rats with hippocampal lesions. **Nature**, vol. 297, pp. 681-683, 1982.
- MUKHERJEE, S. Alcohol metabolism and generation of free radicals: A deep insight. **OA Alcohol** Jul 18;2(1):10, 2014.
- NAGEL, B. J.; SCHWEINSBURG, A. D.; PHAN, V.; TAPERT, S. F. Reduced hippocampal volume among adolescents with alcohol use disorders without psychiatric comorbidity. **Psychiatry**, v. 139, p. 181-190, 2005.
- NEEPER, S.A.; GÓMEZ-PINILLA, F.; CHOI, J.; COTMAN, C.W. Physical activity increases mRNA for brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor in rat brain. **Brain Res.** Jul 8;726(1-2):49-56, 1996.
- NIAAA - National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism (NIAAA). **National Institute of Alcohol Abuse and Alcoholism Council approves definition of binge drinking.** 2004. Disponível em: < <http://pubs.niaaa.nih.gov/publications> >. Acesso em 20 de novembro de 2018

NOGALES, F.; RUA, R.M.; OJEDA, M.L.; MURILLO, M.L.; CARRERAS, O. Oral or intraperitoneal binge drinking and oxidative balance in adolescent rats. *Chem Res Toxicol* 27(11): 1926-33, 2014.

NRC. NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals: Eighth Edition, *The National Academies Press, Washington, DC*, 2011.

O'CALLAGHAN, R.; OHLE, R.; KELLY, A. The effects of forced exercise on hippocampal plasticity in the rat: A comparison of LTP, spatial- and non-spatial learning. *Behavioural Brain Research*, 176(2), 362–366, 2007.

OH-ISHI, S.; KIZAKI, T.; OKAWARA, T.; SAKURAI, T.; IZAWA, T.; NAGATA, N. OHNO, H. Endurance training improves the resistance of rat diaphragm to exercise-induced oxidative stress. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, v. 156, p. 1579–1585, 1997b.

OLDS, J. Learning and the Hippocampus. In: CRAVER, C. F. *The Making of a Memory Mechanism*. V. 36, p. 153-195, 2003.

OLIVEIRA, A. C.; PEREIRA, M. C.; SANTANA, L. N.; FERNANDES, R. M.; TEIXEIRA, F. B.; OLIVEIRA, G. B.; FERNANDES, L. M.; FONTES-JUNIOR, E. A.; PREDIGER, R. D.; CRESPO-LOPEZ, M. E.; GOMES-LEAL, W.; LIMA, R. R.; MAIA, C. S. F. Chronic ethanol exposure during adolescence through early adulthood in female rats induces emotional and memory deficits associated with morphological and molecular alterations in hippocampus. *J Psychopharmacol*. 29:6, 712-24, 2015.

OLNEY, J.W.; DE GUBAREFF, T.; COLLINS, J. F. Stereospecificity of the gliotoxic and anti-neurotoxic actions of alpha-aminoadipate. *Neurosci. Lett.*, v. 19, p. 277-282, 1980.

OLTON D.S.; PAPAS, B. C. Spatial memory and hippocampal function. *Neuropsychology*, vol. 17, no. 6, pp. 669 – 682, 1978.

OMS. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Global status report on alcohol and health 2014**. Geneva: World Health Organization; 2015. Disponível em: <<http://www.who.int/gho/alcohol/en/>>

OMS. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Inequalities in Young people's health. Health Behaviour in school-Aged Children**. International Report from 2005-2006. Health Police for children and adolescents. N. 5, 2008.

OMS. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **International Classification of Diseases (CID)**. 10th ed., Geneva, 2006.

OMS. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **International guide for monitoring alcohol consumption and related harm**. GENEVA, 2002.

OMS. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Global status report on alcohol and health 2018**. Geneva: World Health Organization, 2018

OMS. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Department of Mental Health and Substance Abuse 2004**. Disponível em: <<http://www.who.int/entity/whr/2004>>. Acesso em: 18 de fevereiro de 2014.

OMS. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Global status report on alcohol and health**. Disponível em: <[http://www.who.int/entity/whr/2002/en/whr02\\_en.pdf?ua=1](http://www.who.int/entity/whr/2002/en/whr02_en.pdf?ua=1)>. Acesso em: 02 de dezembro de 2014.

ORHOY, A.; ERGAZ, Z. Alcohol abuse in pregnant women: effects on the fetus and newborn, mode of action and maternal treatment. **Int J Environ Res Public Health**, vol. 7, no. 2, pp. 364-379, 2010.

OZAWA, S.; KAMIYA, H.; TSUZUKI, K. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. **Prog. Neurobiol**, v. 54, p. 581-618, 1998.

PASCUAL, M.; PLA, A.; MIÑARRO, J.; GUERRI, C. Neuroimmune activation and myelin changes in adolescent rats exposed to high-dose alcohol and associated cognitive dysfunction: a review with reference to human adolescent drinking. **Alcohol Alcohol**. 2014 v. 49 (2) p. 187-192, 2014.

PATEL, A. V.; FEIGELSON, H. S, TALBOT, J. T.; McCULLOUGH, M. L.; RODRIGUEZ, C.; PATEL, R. C.; THUN, M. J.; CALLE, E. E. The role of body weight in the relationship between physical activity and endometrial cancer: results from a large cohort of US women. **Int. J. Cancer**, v. 123 (8), p. 1877– 1882, 2008.

PATTEN, A. R.; YAU, S. Y.; FONTAINE, C. J.; MECONI, A.; WORTMAN, R. C.; CHRISTIE, B. R. The Benefits of Exercise on Structural and Functional Plasticity in the Rodent Hippocampus of Different Disease Models. **Brain Plasticity**, vol. 1, no. 1, pp. 97–127, 2015.

PAUL S. M. Alcohol-sensitive GABA receptors and alcohol antagonists. **PNAS**. v. 103 (22), p. 8307– 8308, 2006.

PECHANSKY, F. et al. Uso de álcool entre adolescentes: conceitos, características epidemiológicas e fatores etiopatogênicos. **Rev Bras Psiquiatria**, 26 [S.1]: 14-17, 2004.

PETIT, G.; KORNREICH, C.; VERBANCK, P.; CAMPANELLA, S. Gender differences in reactivity to alcohol cues in binge drinkers: A preliminary assessment of event-related potentials. **Psychiatry Research**. 2013; 209: 494-503.

PIRES, V.A.; PAMPLONA, F.A.; PANDOLFO, P.; FERNANDES, D.; PREDIGER, R.D.; TAKAHASHI, R.N. Adenosine receptor antagonists improve short-term object-recognition ability of spontaneously hypertensive rats: a rodent model of attention-deficit hyperactivity disorder. **Behav Pharmacol**, 20:134-45, 2009.

POWERS, S.; CRISWELL, D.; LAWLER, J.; JI L.; MARTIN, D.; HERB, R.; DUDLEY, G. Influence of exercise and fiber type on antioxidant enzyme activity in rat skeletal muscle. **American Journal of Physiology** [S.I.]. v. 266, p. 375– 380, 1994.

PREDIGER, S. The relevance of didactic categories for analysing obstacles in conceptual change: Revisiting the case of multiplication of fractions. **Learning and instruction**, vol. 18, no. 1, pp. 3-17, 2008.

PRUSKY, G. T.; DOUGLAS, R. M.; NELSON, L.; SHABANPOOR, A.; SUTHERLAND, R. J. Visual memory task for rats reveals an essential role for hippocampus and perirhinal cortex. **Proc Natl Acad Sci U S A**, vol. 101, no. 14, pp. 5064, 2004.

- PURVES, W.K. et al. *Vida: A Ciência da Biologia*. 6.ed. v.2, Ed. **Artmed**, 2005.
- QUINTANILHA, A. T. Effects of physical exercise and/or vitamin E on tissue oxidative metabolism. **Biochemical Society Transaction**, v. 3 (12), p. 403-404, 1984.
- RADAK, Z.; TOLD, A.; SZABO, Z.; SIAMILIS, S.; NYAKAS, C.; SILYE, G.; JAKUS, J. AND GOTO, S. The effects of training and detraining on memory, neurotrophins and oxidative stress markers in rat brain. **Neurochem Internat.**, v. 49, p. 387–392, 2006.
- RAMOS-VASCONCELOS, G.R.; CARDOSO, L.A.; HERMES-LIMA, M. Seasonal modulation of free radical metabolism in estivating land snails *Helix aspersa*. **Comp. Biochem. Physiol.**, vol. 140, pp. 165–174, 2005.
- RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radic Biol Med**, vol. 26, no. 9-10, pp. 1231-7, 1999.
- REHM, J. In: JAMISON, D. *Disease control priorities in developing countries*. 2.ed. New York: **Oxford University Press.**, cap 47, p.887-906, 2006.
- ROEDIGER, H. L.; KARPICKE, J. D. Test-enhanced learning: Taking memory test improves long-term retention. **Psychological Science**, v. 17, p. 249- 255, 2006b.
- ROEDIGER, H. L.; KARPICKE, J. D. The Power of testing memory: Basis research and implications of educational practice. **Perspectives on Psychological Science**, vol 1, p. 181-210, 2006a.
- RUFINO, R. E.; BRITO, E. S.; DE MORAIS, S. M. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS<sup>o+</sup>. *Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical*, 2007., pp. 1-4, 2007.
- RUSSO, S. J.; MURROUG, J. W.; HAN, M. H; CHARNEY, D. S.; NESTLER, E. J. Neurobiology of resilience. **Nat Neurosci**, v. 15 (11), p. 1475-1484, 2012.
- RUTTEN, K.; RENEERKENS, O. A. H.; HAMERS, H.; SIK, A.; MCGREGOR, IS.; PRICKAERTS, J. Automated scoring of novel object recognition in rats. **Journal of Neuroscience Methods**, vol. 171, pp. 72-77, 2008.
- SCHNEIDER, C. D.; BARP, J.; RIBEIRO, J. L.; BELLÓ-KLEIN, A.; OLIVEIRA, A. R. Oxidative Stress After Three Different Intensities of Running. **Canadian Journal of Applied Physiology**, 30(6), 723–734, 2005.
- SCOVILLE, W.B; MILNER, B. Loss recent memory after bilateral hippocampal lesion. *J. neurol.* **Neurosurg. Psychiat.** 20, 11, 1957.
- SETSHEDI, M., WANDS, J. R., & DE LA MONT, S. M. Acetaldehyde Adducts in Alcoholic Liver Disease. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 3(3), 178–185, 2010.
- SHAMSAEI, N.; ERFANI, S.; FEREDONI, M.; ALI, S. Neuroprotective Effects of Exercise on Brain Edema and Neurological Movement Disorders Following the Cerebral Ischemia and Reperfusion in Rats. **Basic Clin Neurosci**. Jan; 8(1): 77–84, 2017.

SHANKAR, K. M., MOHAN, C.V. and NANDEESHA, M. C. Promotion of substrate based microbial biofilms in ponds – a low cost technology to boost fish production. **NAGA–ICLARM Quarterly**, v. 21, p. 18-22, 1998.

SHARMA, V.; COLLINS, L.B.; CHEN, T.H.; HERR, N.; TAKEDA, S.; SUN, W.; SWENBERG, J.A.; NAKAMURA, J. Oxidative stress at low levels can induce clustered DNA lesions leading to NHEJ mediated mutations. **Oncotarget**, 7:25377–25390, 2016.

SHEN, X., LI, A., ZHANG, Y., DONG, X., SHAN, T., WU, Y., HU, Y. The Effect of Different Intensities of Treadmill Exercise on Cognitive Function Deficit Following a Severe Controlled Cortical Impact in Rats. **International Journal of Molecular Sciences**, vol. 14, no.11, 21598–21612, 2013.

SILVEIRA, C. C.; FERNANDES, L. M.; SILVA, M. L.; D. A., LUZ; GOMES A. R. Q.; MONTEIRO, M. C.; MACHADO, C. S.; TORRES, Y. R.; LIRA, T. O.; FERREIRA, A. G.; FONTES-JÚNIOR, E. A.; MAIA, C. S. F. Neurobehavioral and Antioxidant Effects of Ethanolic Extract of Yellow Propolis. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, vol. 2016, 14 pages, 2016.

SINFORIANI, E.; ZUCHELLA, C.; PASOTTI, C.; CASONI, F.; BINI, P.; COSTA, A. The effects of alcohol on cognition in the elderly: from protection to neurodegeneration. **Functional Neurology**, v. 26 (2), p. 103-106, 2011.

SMITH AD, ZIGMOND MJ. Can the brain be protected through exercise? Lessons from an animal model of parkinsonism. **Exp Neurol**. Nov;184(1):31-9, 2003.

SMITH PK, KROHN RI, HERMANSON GT, MALLIA AK, GARTNER FH, PROVENZANO MD, FUJIMOTO EK, GOEKE NM, OLSON BJ and KLENK DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Anal Biochem**, vol. 150, pp. 76-85, 1985.

SONG, Y. J.; SONG, YJ.; SAWAMURA, M.; IKEDA, K.; IGAWA,S.;NARA, Y.;YAMORI, Y. Training in swimming reduces blood pressure and increases muscle glucose transport activity as well as GLUT4 contents in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. **Appl Human Sci [S.I.]**, v. 17 (6), p. 275-80, 1998.

SOWELL, E. R.; THOMPSON, P. M. LEONARD, C. M.; WECOME, S. E.; KAN, E.; TOGA, A. W. Longitudinal mapping of cortical thickness and brain growth in normal children. **J. Neurosci**, 24 (38), p. 8223-8231, 2004.

SPEAR, L.P. Adolescent brain development and animal models. **Ann NY Acad Sci**; 1021: 23 – 26, 2004.

SPEAR, L.P. The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. **Neurosci Biobehav Rev**. 24: 417 – 463, 2000.

SPEAR, L.P.; SWARTZWELDER, H.S. Adolescent alcohol exposure and persistence of adolescent-typical phenotypes into adulthood: A mini-review. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**. 45: 1–8, 2014.

SQUIRE, L. R. Declarative and nondeclarative memory: multiple brain systems supporting learning and memory. **J Cogn Neurosci**, v. 4, p. 232-243, 1992a.



SQUIRE, L. R. Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys and humans. **Psychol Rev**, v. 99, p. 195-231, 1992b.

STANLEY, E. M.; WILSON, M. A.; FADEL, J. R. Hippocampal neurotransmitter efflux during one-trial novel object recognition in rats. **Neurosci Lett**, vol. 511, no. 1, pp. 38-42, 2012.

SVENSSON, M.; ROSVALL, P.; BOZA-SERRANO, A.; ANDERSSON, E.; LEXELL, J.; DEIERBORG, T. Forced treadmill exercise can induce stress and increase neuronal damage in a mouse model of global cerebral ischemia. **Neurobiology of Stress**, vol. 5, pp. 8–18, 2016.

TABAKOFF, B; HELLEVUO K; HOFFMAN, PL. Alcohol. In: Schuster CR, Gust SW & Kuhar MJ (Editors), Handbook of Experimental Pharmacology. v. 118, **Pharmacological Aspects of Drug Dependence**. Springer-Verlag, Berlin, 373-458, 1996.

TAHAMTAN, M.; ALLAHTAVAKOLI, M.; ABBASNEJAD, M.; ROOHBAKHSH, A.; TAGHIPOUR, Z.; TAGHAVI, M.; KHODADADI, H.; SHAMSIZADEH, A. Exercise Preconditioning Improves Behavioral Functions following Transient Cerebral Ischemia Induced by 4-Vessel Occlusion (4-VO) in Rats. **Arch Iran Med.**, vol 16, no.12, pp. 697 – 704, 2013.

TEIXEIRA, F.B.; SANTANA, L.N.; BEZERRA, F.R.; DE CARVALHO, S.; FONTES-JÚNIOR, E.A.; PREDIGER, R.D.; CRESPO-LÓPEZ, M.E.; MAIA, C.S.; LIMA, R.R. Chronic ethanol exposure during adolescence in rats induces motor impairments and cerebral cortex damage associated with oxidative stress. **PLoS One**. 26: 9(6):e101074, 2014.

TOGA, A. W.; THOMPSON, P. M. Mapping brain asymmetry. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 4, 37-48, 2003.

VAGHEF L, B. S.; MOGHADDAM, V. M. The Effect of Escalating Dose, Multiple Binge Methamphetamine Regimen and Alcohol Combination on Spatial Memory and Oxidative Stress Markers in Rat Brain. **J Alcohol Drug Depend**, vol. 2, no.3, 2014.

VASCONCELOS, M.; CALVACANTE, A.; AGUILAR, M.; SOUSA, F.; FONTELES, F.; VIANA, B. Effects of chronic ethanol treatment on monoamine levels in rat hippocampus and striatum. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, (12), p.1839-1846, 2004.

VAYNMAN, S.; GOMEZ-PINILLA, F. License to run: exercise impacts functional plasticity in the intact and injured central nervous system by using neurotrophins. **Neurorehabil Neural Repair [S.I.]**, v.19 (4), p. 283-95, 2005.

VISSING, J.; ANDERSEN, M.; DIEMER, N. H. Exercise-induced changes in local cerebral glucose utilization in the rat. **J Cereb Blood Flow Metab [S.I.]**, v. 16 (4), p. 729-36,1996.

WANG, D.; WANG, Y.; CHEN, W.; MA, M.;HUA, Y.; KANG, J. Aerobic Exercise Alleviates Hippocampus Injury in Chronic Stressed Depression Rats. **European Journal of Experimental Biology**, Vol.8 No.4:26, 2018.

WEGNER, A. J., GUNTNER, A., FAHLE M. *Visual performance and recovery in recently detoxified alcoholics*. **Alcohol and Alcoholism**, V. 36, 2, 1, p. 171–179, 2001.

WESTERMEYER, J.F.; HARROW, M.; MARENCO J.T. Risk for suicide in schizophrenia and other psychotic and nonpsychotic disorders. **J Nerv Ment Dis.**, v. 179 (5), p. 259-66, 1991.

WHS - World health statistics. Monitoring health for the SDGs, sustainable development goals. Geneva: **World Health Organization**; 2018

WILMORE, J. H.; COSTILL, D. L.; Fisiologia do esporte e do exercício. In: **Adaptações Neuromusculares ao Treinamento de força**, WILMORE J. H.; COSTILL, D. L., Barueri: Editora Manole, p. 27-51, 2001.

WITT, E. D. Puberty, hormones, and sex differences in alcohol abuse and dependence. **Neurotoxicol. Teratol.**, v. 29, p. 81-95. 2007.

WONG, D.; Ferreira, J. R. O.; Fonteles, M. M. F.; Viana, G. S. B.; Souza, F. C. F.; Vasconcelos, S. M. M. Álcool e neurodesenvolvimento: aspectos genéticos e farmacológicos. **Revista eletrônica de farmácia**, Vol. (1), p. 8-23, 2008.

WONG, S. YS., STEWART, W.M., WOO, J., LEUNG, J. The influence of multi-morbidity and self-reported socio-economic standing on the prevalence of depression in an elderly Hong Kong population. **BMC Public Health**. 8:119, 2008.

XIAFENG, S.; AIPING, L.I.; YULING, Z.; XIAOMIN, D.; TIAN, S.; YI, W.U.; JIE, J.I.A.; YONGSHAN, H.U. The Effect of Different Intensities of Treadmill Exercise on Cognitive Function Deficit Following a Severe Controlled Cortical Impact in Rats. **International Journal of Molecular Sciences**, vol. 14, no.11, pp. 21598–21612, 2013.

YANG, J-Y.; XUE, X.; TIANA, H.; WANG, X-X.; DONG, Y-X.; WANG, F.; ZHAO, YAO, X-C.; CUI, W.; WU, C.F. Role of microglia in ethanol-induced neurodegenerative disease: Pathological and behavioral dysfunction at different developmental stages. **Pharmacology & Therapeutics**. v. 3, p. 321–337, 2014

YU, B. P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. **Physiological Reviews**, 74(1), 139–162, 1994.

ZAKHARI S. Overview: how is alcohol metabolized by the body? **Alcohol Research & Health**, v. 29 (4), p. 245- 254, 2006.

ZAKHARI, S.; LI, TK. Determinants of alcohol use and abuse: Impact of quantity and frequency patterns on liver disease. **Hepatology**, v. 46 (6), p. 2032–2039, 2007.

ZEIGLER D. W.; WANG, C. C.; YOAST A.; DICKINSON, B. D.; MCCAFFREE, MA.; ROBINOWITZ, C. B.; STERLING, M. L. The neurocognitive effects of alcohol on adolescents and college students. **Preventive Medicine**, v. 40, p. 23 – 32, 2005.

ZOLA-MORGAN, S. M.; SQUIRE, L. R. The primate hippocampal formation: evidence for a time-limited role in memory storage. **Science**, v. 250 (4978), p. 288-290, 1990.