



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA**  
**CELULAR**

**BRUNO GONÇALVES PINHEIRO**

**Investigação dos efeitos da cafeína e SCH58261 sobre as alterações comportamentais e no estresse oxidativo, e papel dos receptores A<sub>2A</sub> na potenciação de longo prazo após intoxicação por etanol em padrão *binge* em ratos fêmeas da adolescência a fase adulta.**

Belém-PA

2022

BRUNO GONÇALVES PINHEIRO

**Investigação dos efeitos da cafeína e SCH58261 sobre as alterações comportamentais e no estresse oxidativo, e papel dos receptores A<sub>2</sub>A na potenciação de longo prazo após intoxicação por etanol em padrão *binge* em ratos fêmeas da adolescência a fase adulta.**

Tese de doutorado apresentada como pré-requisito para a obtenção do título de Doutorado no Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular. Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Cristiane do Socorro Ferraz Maia.

Belém-PA

2022

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)

---

P654i Pinheiro, Bruno Gonçalves.

Investigação dos efeitos da cafeína e SCH58261 sobre as alterações comportamentais e no estresse oxidativo, e papel dos receptores A2A na potenciação de longo prazo após intoxicação por etanol em padrão binge em ratos fêmeas da adolescência a fase adulta. / BRUNO PINHEIRO. — 2022.

18 f. : il. color.

Orientador(a): Prof<sup>a</sup>. Dra. Cristiane Maia

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, Belém, 2022.

1. Binge drinking Etanol. 2. Cafeína. 3. Adenosina. 4. Receptor A2A. 5. Adolescência.  
I. Título.

CDD 615.1098115

---

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Bruno Gonçalves Pinheiro

**Investigação dos efeitos da cafeína e SCH58261 sobre as alterações comportamentais e no estresse oxidativo, e papel dos receptores  $A_2A$  na potenciação de longo prazo após intoxicação por etanol em padrão *binge* em ratos fêmeas da adolescência a fase adulta.**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Neurociências e Biologia Celular. Área de concentração: Neurociências.

Aprovado em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**Banca Examinadora:**

**Prof (a). Dra.: Cristiane do Socorro Ferraz Maia (Presidente da Banca)**

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

**Prof (a). Dra.: Marta Chagas Monteiro (Membro)**

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

**Prof. Dr.: Enéas de Andrade Fontes Junior (Membro)**

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

**Prof. Dr.: Jofre Jacob da Silva Freitas (Membro)**

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

**Prof. Dr.: Rui Daniel Schröder Prediger (Membro)**

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

**Prof (a). Dra.: Luanna de Melo Pereira Fernandes (Suplente)**

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho à minha esposa Karen e filha Maria Luisa, meus pais Álvaro e Conceição; minha irmã Arielle e aos meus parentes da Família Gonçalves e Pinheiro, por serem meu suporte emocional na construção deste Caminho.

## AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus, que me apoia todo momento e sempre peço e agradeço em silêncio, porém com muita fé para iluminar minhas escolhas, mente e família.

À minha amada família Karen e Maria Luisa, na qual sempre me apoiaram nos momentos difíceis. Sempre me dando força, calma e amor. Amo vocês!!

Aos meus pais Álvaro e Conceição, que me criaram na batalha da vida com muito amor e dedicação para formação de meu caráter, personalidade e dedicação ao estudo.

À minha irmã Arielle que é um doce de pessoa, amorosa, lutadora e vencedora nesta vida.

À matriarca da família Gonçalves, minha avó Maria Herundina (*in memoriam*) por todos os valores repassados como dignidade, bondade, alegria, construção do seio familiar e religiosidade.

À família Gonçalves e Pinheiro, obrigado pelas preocupações, anseios, ajudas e valores.

À minha orientadora Profa. Dra. Cristiane Maia, por me ajudar no caminho acadêmico na construção de professor e pesquisador, bem como permitir meu amadurecimento na vida, nas relações interpessoais e por acreditar em meu potencial.

Ao professor Dr. Enéas Fontes, que sempre admirei como pesquisador e em sua tranquilidade e palavra, me serviu como um espelho.

Ao meu primeiro orientador de iniciação científica e de mestrado Dr. Pergentino José da Cunha Sousa, que foi meu primeiro e eterno mestre.

Aos meus colegas e irmãos de UFPA e LAFICO, Sabrina, Luanna, Diandra, Carla, Chirlene, Mayara, Fábio, Letícia, Sarah, Harumi e Pablo pelo apoio total como equipe ao me ajudarem na construção do meu trabalho.

Aos outros colegas de laboratório externo, Keuri e Paulo, no auxílio da construção do meu trabalho.

Aos professores Dr. Rodrigo A. Cunha e Dra. Samira pela colaboração realizada entre o LAFICO e o Centro de Neurociências em Coimbra.

Agradeço à UFPA e ao Programa de Neurociências e Biologia Celular do ICB pelo suporte.

## **EPÍGRAFE**

“O sucesso é a soma de pequenos esforços repetidos dia após dia.”

(Robert Collier)

## RESUMO

**Introdução:** O consumo *binge* de etanol é um padrão de ingestão intermitente e episódico envolvido em vários distúrbios cerebrais que afetam adolescentes, considerados mais suscetíveis aos danos persistentes até a idade adulta. Nos efeitos deletérios do etanol, um mecanismo de intoxicação importante é a superprodução de adenosina, que causa hiperexcitabilidade em seus receptores gerando alterações comportamentais e estresse oxidativo. Estes receptores são antagonizados pela cafeína, um composto bioativo que pode modular a superativação deletéria do etanol. **Objetivo:** O objetivo deste estudo foi investigar os efeitos da administração de cafeína nas alterações comportamentais relacionados à locomoção, ansiedade, cognição e balanço oxidativo induzidos pelo etanol no padrão *binge drinking* durante a adolescência. Além disso, visa avaliar qual a contribuição dos receptores A<sub>2A</sub> nas alterações observadas, incluindo a potenciação de longo prazo (LTP). **Material e Métodos:** Ratas Wistar fêmeas (35 dias de idade; n = 102) foram alocadas em seis grupos: controle (água destilada, v.o), etanol (3 g/kg/dia; 3 dias *on*-4 dias *off*, v.o), cafeína (10 mg/kg/dia, v.o), cafeína + etanol, antagonista A<sub>2A</sub> SCH58261 (0,1 mg/kg/dia, intraperitoneal – i,p) e etanol + SCH58261. Os animais foram submetidos aos testes comportamentais do campo aberto, reconhecimento de objeto e labirinto em cruz elevado. Foram avaliados os parâmetros da bioquímica oxidativa da capacidade antioxidante equivalente trolox (TEAC), glutaciona (GSH), catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), óxido nítrico (NO), substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no córtex pré-frontal e hipocampo. Foram avaliados através da eletrofisiologia os registros de LTP no córtex pré-frontal medial (mPFC), porção ventral (vHip) e dorsal (dHIP) do hipocampo dos grupos controle, etanol, etanol + SCH58261 e SCH58261. **Resultados:** A cafeína preveniu os prejuízos comportamentais induzidos pelo etanol, através do bloqueio dos receptores A<sub>2A</sub>. Além disso, atenuou o estresse oxidativo induzido pelo *binge drinking* por vias alternativas do receptor A<sub>2A</sub>. O bloqueio dos receptores A<sub>2A</sub> aumentou os níveis de LTP no mPFC e vHIP, porém diminuiu no dHIP. **Conclusão:** A cafeína apresentou neuroproteção nas modificações comportamentais e no estresse oxidativo induzidos pelo modelo *binge drinking* em ratas adolescentes. Além disso, o bloqueio dos receptores A<sub>2A</sub> mitigou as alterações comportamentais observadas, com melhora dos níveis de LTP no córtex pré-frontal e hipocampo, o que sugere a contribuição desta via para a neuroproteção em déficits induzidos pela exposição ao etanol durante a adolescência.

**Palavras-chave:** *Binge drinking*, Etanol, Cafeína, Adenosina, Receptor A<sub>2A</sub>, Adolescência, estresse oxidativo, potenciação de longo prazo.



## ABSTRACT

**Introduction:** Binge consumption of ethanol is an intermittent and episodic pattern of ingestion involved in several brain disorders that affect adolescents, considered more susceptible to damage that persists into adulthood. In the deleterious effects of ethanol, an important intoxication mechanism is the overproduction of adenosine, which causes hyperexcitability in its receptors, generating behavioral changes and oxidative stress. These receptors are antagonized by caffeine, a bioactive compound that can modulate the deleterious overactivation of ethanol. **Objective:** The aim of this study was to investigate the effects of caffeine administration on behavioral changes related to locomotion, anxiety, cognition and oxidative balance induced by ethanol in the binge drinking pattern during adolescence. In addition, it aims to assess the contribution of A<sub>2A</sub> receptors in the observed changes, including long-term potentiation (LTP). **Material and Methods:** Female Wistar rats (35 days old; n = 102) were allocated into six groups: control (distilled water, v.o), ethanol (3 g/kg/day; 3 days on-4 days off, v.o), caffeine (10 mg/kg/day, v.o), caffeine + ethanol, A<sub>2A</sub> antagonist SCH58261 (0.1 mg/kg/day, intraperitoneal - i.p) and ethanol + SCH58261. The animals were submitted to open field behavioral tests, object recognition and elevated plus maze. The oxidative biochemistry parameters of trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC), glutathione (GSH), catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), nitric oxide (NO), thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) in the pre- frontal and hippocampus. LTP recordings in the medial prefrontal cortex (mPFC), ventral (vHip) and dorsal (dHIP) portions of the hippocampus of the control, ethanol, ethanol + SCH58261 and SCH58261 groups were evaluated through electrophysiology. **Results:** Caffeine prevented ethanol-induced behavioral impairments, including by blocking A<sub>2A</sub> receptors. In addition, it attenuated the oxidative stress induced by binge drinking by alternative A<sub>2A</sub> receptor pathways. Blockade of A<sub>2A</sub> receptors increased LTP levels in mPFC and vHIP, however decreased in dHIP. **Conclusion:** Caffeine showed neuroprotection in behavioral changes and oxidative stress induced by the binge drinking model in adolescent rats. In addition, blockade of A<sub>2A</sub> receptors mitigated the observed behavioral changes, with improvement of LTP levels in the prefrontal cortex and hippocampus, which suggests the contribution of this pathway to neuroprotection in deficits induced by ethanol exposure during adolescence.

**Keywords:** Ethanol Binge Drinking, Caffeine, Adenosine A<sub>2A</sub> receptor, Adolescence, oxidative stress, and long- term potentiation.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 01 - Estimativa do consumo per capita de álcool por país	23
Figura 02 - Prevalência de consumo em <i>binge</i> em 2006 e 2012 entre adultos bebedores	25
Figura 03 - Neurocircuitos entre CPF e HIP	27
Figura 04 - Organização do mPFC e camadas	29
Figura 05 - Organização das camadas no mPFC	30
Figura 06 - Vias aferentes mPFC e eferentes	31
Figura 07 - Organização e neurocircuitaria hipocampal	33
Figura 08 - Mecanismo de fase inicial de LTP	35
Figura 09 - Mecanismo de fase tardia de LTP	36
Figura 10 - Metabolismo do etanol no SNC	40
Figura 11 - Balanço de neurotransmissores inibitórios (GABA) e excitatórios (GLUTAMATO) dependentes da exposição ao etanol	41
Figura 12 - Representação de estresse oxidativo com alterações comportamentais e cognitivas	44
Figura 13 - Receptores de ADO	45
Figura 14- Regulação do etanol da produção de ADO	48
Figura 15- Vias diretas (Go) e indiretas (No Go) do circuito gânglio basal talamocortical	50
Figura 16- Estrutura da Caf	57
Figura 17- A ação da ADO nos receptores A <sub>1</sub> e A <sub>2A</sub> promove importante regulação da neurotransmissão no cérebro	64
Figura 18 - Linha do tempo e esquema de tratamento experimental	69
Figura 19 - Teste do Campo Aberto	72
Figura 20 - Teste de Reconhecimento de Objeto	73
Figura 21- Teste de Labirinto em Cruz Elevado	74

- Figura 22- Efeitos da cafeína (10 mg/kg/dia) após *binge* drinking etanol (3,0 g/kg/dia; 3 dias on - 4 dias off) no TCA da adolescência à idade adulta de ratos fêmeas no parâmetro distância total percorrida. 85
- Figura 23- Efeitos da SCH58261 (0,1 mg/kg/dia) (A) um antagonista de A<sub>2A</sub> após *binge* drinking etanol (3,0 g/kg/dia; 3 dias on - 4 dias off) no TCA da adolescência à idade adulta de ratos fêmeas no parâmetro distância total percorrida 87
- Figura 24- Efeitos da cafeína (10 mg/kg/dia) após o *binge* drinking etanol (3,0 g/kg/dia; 3 dias on -4 dias off) no TCA da adolescência à idade adulta de ratos fêmeas sobre o parâmetro distância central percorrida e tempo de permanência na área central 89
- Figura 25- Efeitos da cafeína (10 mg/kg/dia) após o *binge* drinking etanol (3,0 g/kg/dia; 3 dias on -4 dias off) no teste de LCE da adolescência à idade adulta de ratos fêmeas na % de entradas de braços abertos e no parâmetro % de tempo de braços abertos 91
- Figura 26-Efeitos de SCH58261 (0,1 mg/kg/dia) um antagonista de A<sub>2A</sub> após o *binge* drinking etanol (3,0 g/kg/dia; 3 dias on -4 dias off) no TCA da adolescência à idade adulta de ratos fêmeas sobre o parâmetro distância central percorrida e tempo de permanência no centro 92
- Figura 27 - Efeitos de SCH58261 (0,1 mg/kg/dia) um antagonista de A<sub>2A</sub> após o *binge* drinking etanol (3,0 g/kg/dia; 3 dias on -4 dias off) no teste de LCE da adolescência à idade adulta de ratos fêmeas na % de entradas de braços abertos no parâmetro % de tempo de braços abertos. 94
- Figura 28-Efeitos da cafeína (10 mg/kg/dia) após o *binge* drinking etanol (3,0 g/kg/dia; 3 dias on -4 dias off) no teste de reconhecimento de objetos da adolescência à idade adulta de ratos fêmeas sobre o tempo de investigação (fase de treinamento) e no teste de reconhecimento de objetos no índice de discriminação (fase de discriminação) 96
- Figura 29- Efeitos de SCH58261 (0,1 mg/kg/dia) um antagonista de A<sub>2A</sub> após o *binge* drinking etanol (3,0 g/kg/dia; 3 dias on -4 dias off) no teste de reconhecimento de objetos da adolescência à idade adulta de ratos fêmeas

sobre o tempo de investigação (fase de treinamento) e no índice de discriminação (fase de discriminação)	97
Figura 30-Efeitos da cafeína (10 mg/kg/dia) após o <i>binge</i> drinking etanol (3,0 g/kg/dia; 3 dias on-4 dias off) sobre o sistema antioxidante não enzimático no CPF e HIP.	99
Figura 31-Efeitos de SCH58261 (0,1 mg/kg/dia) um antagonista A <sub>2A</sub> após o <i>binge</i> drinking etanol (3,0 g/kg/dia; 3 dias on-4 dias off) sobre o sistema antioxidante não enzimático no CPF e HIP.	102
Figura 32- Efeitos da cafeína (10 mg/kg/dia) após o <i>binge</i> drinking etanol (3,0 g/kg/dia; 3 dias on-4 dias off) no sistema enzimático antioxidante no CPF e HIP.	104
Figura 33-Efeitos de SCH58261 (0,1 mg/kg/dia) um antagonista de A <sub>2A</sub> após o <i>binge</i> drinking etanol (3,0 g/kg/dia; 3 dias on-4 dias off) no sistema enzimático antioxidante no CPF e HIP.	105
Figura 34-Efeitos da cafeína (10 mg/kg/dia) após o <i>binge</i> drinking etanol (3,0 g/kg/dia; 3 dias on-4 dias off) no sistema oxidante no CPF e HIP.	107
Figura 35- Efeitos de SCH58261 (0,1 mg/kg/dia) um antagonista de A <sub>2A</sub> após o <i>binge</i> drinking etanol (3,0 g/kg/dia; 3 dias on-4 dias off) no sistema oxidante no CPF e HIP.	108
Figura 36- Efeitos de SCH58261 (0,1 mg/kg/dia) um antagonista de A <sub>2A</sub> após o <i>binge</i> drinking etanol (3,0 g/kg/dia; 3 dias on -4 dias off) sobre a formação de LTP da adolescência à idade adulta de ratos fêmeas no mPFC pré-límbico.	110
Figura 37- Efeitos de SCH58261 (0,1 mg/kg/dia) um antagonista de A <sub>2A</sub> após o <i>binge</i> drinking etanol (3,0 g/kg/dia; 3 dias on -4 dias off) sobre a formação de LTP da adolescência à idade adulta de ratos fêmeas na porção ventral do HIP.	112
Figura 38- Efeitos de SCH58261 (0,1 mg/kg/dia) um antagonista de A <sub>2A</sub> após o <i>binge</i> drinking etanol (3,0 g/kg/dia; 3 dias on -4 dias off) sobre a formação de LTP da adolescência à idade adulta de ratos fêmeas na porção dHIP	113

## **LISTA DE QUADROS**

QUADRO 1 – Descrição dos grupos experimentais

70

## **LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS**

**A<sub>1</sub>** - Receptor de Adenosina tipo 1

**A<sub>2A</sub>** – Receptor de Adenosina tipo 2A

**A<sub>2B</sub>** -Receptor de Adenosina tipo 2B

**A<sub>3</sub>** – Receptor de Adenosina tipo 3

**Ach** - Acetilcolina

**ADO** - Adenosina

**ADH** - Álcool desidrogenase

**ALDH** - Aldeído desidrogenase

**AMPA** - Receptor  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-ácido isoxazolepropônico

**Ant** - Antagonista

**ATP** – Adenosina Trifosfato

**CA1** – Corno de Amon 1

**CA2** - Corno de Amon 2

**CA3** - Corno de Amon 3

**Caf** – Cafeína

**CAMKII**- Proteínas quinases II dependentes de  $Ca^{+2}$ /Calmodulina

**cAMP** – Adenosina monofosfato cíclico.

**CAT** - Catalase

**CID** – Classificação Internacional das Doenças

**CPF** – Córtex Pré-Frontal

**CYP2E1** – Citocromo 2E1

**DA** – Dopamina

**DG** – Giro denteado

**dHIP** – Hipocampo dorsal

**EBA** – Entrada nos braços abertos

**EBF** – Entrada nos braços fechados

**EC** – Córtex entorrinal

**ENT1**- Transportador Nucleosídeo Equilibrativo tipo 1

**ERO** – Espécie reativa de oxigênio

**ERN** – Espécie reativa de nitrogênio

**fEPSP**- Potencial excitatório pós sináptico

**GABA** – Ácido gamma aminobutírico

**GABA<sub>A</sub>** – Receptor gamma aminobutírico tipo A

**Gi** – Proteína G do tipo inibitória

**GLUT** – Glutamato

**GPI** - *globus pallidus*

**Gs** – Proteína G do tipo estimulatória

**GSH** - Glutationa

**GSH-Px** – Glutationa Peroxidase

**Gred** – Glutationa Redutase

**HIP** – Hipocampo

**i.p** – Via intraperitoneal

**LTP** – Potencialização de longo prazo

**mGLUT** – Receptores glutamatérgicos metabotrópicos

**mPFC** – Córtex pré-frontal medial

**NA** – Noradrenalina

**NAc** – núcleo accumbens

**NADH** - nicotinamida adenina dinucleótido reduzida

**NIAA** - National Institute on Alcohol and Alcoholism.

**NMDA**- Receptores N-metil-D-aspartato

**NO** – Óxido nítrico

**OMS** - Organização mundial da saúde

**P1** – Receptor purinérgico do tipo 1

**RO** – Reconhecimento de Objeto

**SEMO** - Sistema de enzimas microsomal de oxidação

**SNr** - *substância nigra pars reticulata*

**SOD** – Superóxido Dismutase

**SNC** – Sistema Nervoso Central

**TBA** – Tempo nos braços abertos

**TBARS** – Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

**TBF** – Tempo nos braços fechados

**TCA** – Teste do campo aberto

**vHIP** – Hipocampo ventral

**v.o** – Via oral

**VTA** -Área tegmental ventral

**5-HT<sub>1</sub>** – Serotonina



## LISTA DE SÍMBOLOS

**Ca<sup>+2</sup>** - Cálcio

**Cu** - Cobre

**g** – Gramas

**g/dL** – Gramas por decilitro

**Hz** - Hertz

**K<sup>+</sup>** - Potássio

**Kg** - Kilogramas

**L** – Litros

**L/Kg** – Litros por quilogramas

**Mn** – Manganês

**μA** - microamper

**min** – minutos

**mg** – miligramas

**mV** - milivolts

**Na<sup>+</sup>** - Sódio

**NO** – Óxido nítrico

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

**ONOO<sup>-</sup>** - Peroxinitrito

**%** - Percentagem

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** – Peróxido de hidrogênio

**HO·** – Radical hidroxil

**Se** - Selênio

**Ω** -microohm

## SUMÁRIO

<b>I. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>21</b>
1.1. HISTÓRICO E ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DE CONSUMO DE ETANOL .....	22
1.2. PADRÃO DE CONSUMO BINGE DRINKING .....	24
1.3. MATURAÇÃO DO CÉREBRO ADOLESCENTE E REDE DE ORGANIZAÇÃO ANATOMO-FISIOLÓGICA DO CPF E HIP .....	26
1.4. ORGANIZAÇÃO E TIPOS DE CÉLULAS NO CPF .....	29
1.5. ORGANIZAÇÃO E NEUROCIRCUITARIA DO HIP .....	33
1.6. PLASTICIDADE E MECANISMOS DE FORMAÇÃO DE LTP .....	35
1.7. ALTERAÇÕES NO SNC INDUZIDOS EM PADRÃO BINGE DRINKING DE ETANOL .....	38
1.8. VIAS DE ALTERAÇÕES INDUZIDAS POR ETANOL .....	39
1.8.1. Farmacocinética e metabolismo oxidativo do etanol .....	39
1.8.2 Vias toxicodinâmicas induzidas por etanol .....	42
1.9. SISTEMA ADENOSINÉRGICO .....	46
1.9.1 Etanol e sistema adenosinérgico .....	48
1.9.1.1. Etanol <i>versus</i> ADO na atividade motora .....	50
1.9.1.2. Etanol <i>versus</i> ADO na ansiedade .....	52
1.9.1.3- Efeitos do etanol <i>versus</i> ADO na cognição .....	55
1.9.2. Cafeína e antagonista seletivo de A <sub>2A</sub> (SCH58261) .....	58
1.9.3. Cafeína e o bloqueio seletivo dos receptores A <sub>2A</sub> como ferramenta terapêutica em desordens motoras, ansiedade e cognitiva .....	60
1.9.3.1. Atividade motora .....	60
1.9.3.2. Ansiedade .....	62
1.9.3.3. Cognição .....	63
<b>II. OBJETIVOS .....</b>	<b>66</b>
2.1. OBJETIVOS GERAIS .....	67
2.1.1. Objetivos específicos .....	67

<b>III. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>68</b>
3.1. ANIMAIS .....	69
3.2. DELINEAMENTO DO ESTUDO E GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	69
3.3. ENSAIOS COMPORTAMENTAIS .....	72
3.3.1 Teste do Campo Aberto .....	72
3.3.2. Teste de Reconhecimento de Objeto.....	73
3.3.3. Labirinto em Cruz Elevado (LCE).....	74
3.4 ENSAIOS DE ESTRESSE OXIDATIVO .....	75
3.4.1. Atividades antioxidantes não-enzimáticas .....	76
3.4.1.1. Capacidade antioxidante total.....	76
3.4.1.2. Níveis de tiol (glutationa total).....	77
3.4.2. Atividades antioxidantes enzimáticas .....	78
3.4.2.1 Atividade enzimática da catalase (CAT) .....	78
3.4.2.2. Atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD) .....	78
3.4.3. Sistema Oxidante .....	79
3.4.3.1. Determinação de Nitritos e Nitratos (marcador para NO).....	79
3.4.3.2. Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS).....	80
3.5 DOSAGEM DE PROTEÍNAS.....	81
3.6. REGISTROS ELETROFISIOLÓGICOS.....	81
3.6.1. Secções cerebrais .....	82
3.6.2. mPFC pré-límbico.....	82
3.6.3. dHIP e vHIP .....	83
3.7. ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	84
<b>IV. RESULTADOS.....</b>	<b>85</b>
4.1. TESTES COMPORTAMENTAIS MOTORES.....	86
4.1.1. A cafeína de longo-prazo evita as alterações motoras provocadas pelo <i>binge drinking</i> etanol durante a adolescência .....	86
4.1.2. O antagonismo seletivo dos receptores A <sub>2A</sub> evitou as alterações motoras espontâneas causadas pelo <i>binge drinking</i> etanol .....	87
4.2. TESTES COMPORTAMENTAIS DE EMOCIONALIDADE.....	89

4.2.1. A cafeína diminui o comportamento do tipo-ansiedade induzido pelo binge drinking etanol no teste do campo aberto e LCE .....	89
4.2.2. O antagonismo seletivo dos receptores A <sub>2A</sub> atenua o comportamento semelhante à ansiedade exibido pelo protocolo de binge drinking etanol .....	93
4.3. <i>TESTES COGNITIVOS</i> .....	96
4.3.1. A cafeína recupera o comprometimento da memória de curto prazo induzido pelo consumo excessivo de etanol .....	96
4.3.2. O bloqueio dos receptores A <sub>2A</sub> medeia os efeitos na memória de curto prazo da Caf no paradigma binge drinking etanol .....	98
4.4. <i>ENSAIOS BIOQUÍMICOS NO CPF E HIP</i> .....	99
4.4.1. A cafeína aumenta o sistema antioxidante não enzimático no CPF e no HIP	99
4.4.2. O bloqueio seletivo do receptor A <sub>2A</sub> medeia os efeitos da cafeína nos níveis de TEAC, mas não no conteúdo de tiol no CPF e no HIP .....	101
4.4.3. A cafeína aumenta o sistema enzimático antioxidante no CPF e no HIP ....	103
4.4.4. O bloqueio seletivo do receptor A <sub>2A</sub> medeia os efeitos da cafeína na SOD no CPF, bem como na SOD e CAT no HIP .....	104
4.4.5. A cafeína reduz os níveis de NO no HIP e de peroxidação lipídica no CPF e HIP	106
4.4.6. O bloqueio de A <sub>2A</sub> reduz os níveis de NO, mas causa peroxidação lipídica no CPF e HIP .....	107
4.5. <i>Registros eletrofisiológicos extracelulares ex-vivo</i> .....	109
4.5.1. <i>Binge drinking</i> etanol apresenta tendência de déficit de LTP e o bloqueio seletivo de A <sub>2A</sub> evita esta alteração no mPFC pré-límbico nos picos populacionais. ....	109
4.5.2. <i>Binge drinking</i> etanol apresentou uma tendência de déficit de LTP e o bloqueio seletivo de A <sub>2A</sub> atenua esta alteração em vHIP .....	111
4.5.3. <i>Binge drinking</i> etanol não induziu déficit de LTP e o bloqueio seletivo de A <sub>2A</sub> não está envolvido nesta alteração no dHIP.....	113
<b>V. DISCUSSÃO</b> .....	<b>115</b>
<b>VI. CONCLUSÃO</b> .....	<b>130</b>
<b>VII. REFERÊNCIAS</b> .....	<b>133</b>

<b>VIII. ANEXOS</b> .....	<b>177</b>
---------------------------	------------

---

---

## I. INTRODUÇÃO

---

---

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. HISTÓRICO E ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DE CONSUMO DE ETANOL

Acredita-se que a bebida alcoólica tem origem na pré-história, mais precisamente durante o período neolítico quando houve a aparição da agricultura e a invenção da cerâmica. A partir de um processo de fermentação natural ocorrido há aproximadamente 10.000 anos, o ser humano passou a consumir e atribuir diferentes significados ao uso do álcool. Os celtas, gregos, romanos, egípcios e babilônicos registraram de alguma forma o consumo e a produção de bebidas alcoólicas (VIALA-ARTIGUES; MECHETTI, 2003). Todavia, devido à grande quantidade de doenças e germes presentes na água, estimularam-se medidas higiênicas para o seu uso (ABREU et al., 2001).

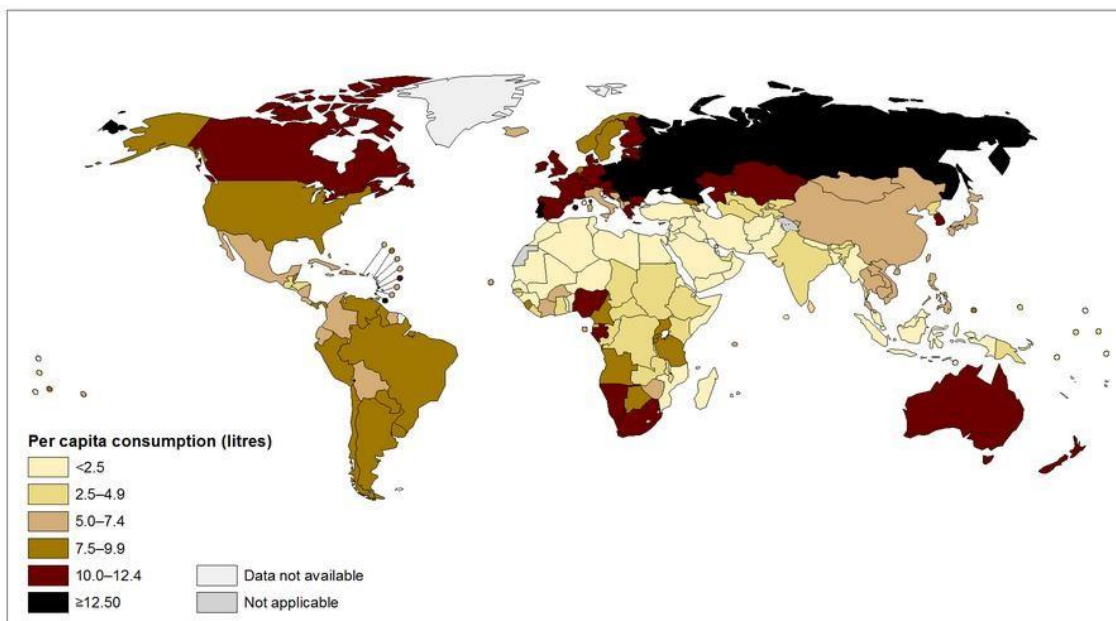
Com a revolução industrial pôde ser observado um grande aumento na oferta e, conseqüentemente, na popularidade das bebidas alcoólicas, principalmente por que estas, antes produzidas artesanalmente, passaram a ser feitas por técnicas e em escala industrial (CARLINI et al., 2010). Até o final do século XVII o consumo de álcool estava generalizado, conotando-se como uma atividade eminentemente social e sendo a bebida considerada “néctar divino” (LARANJEIRA; ROMANO, 2004), em contrapartida no mesmo período seu uso excessivo passa a ser visto por alguns como doença ou desordem (JEROME, 1993).

Durante o século XX, países como a França passam a estabelecer a maioria de 18 anos para o consumo de álcool e em janeiro de 1920 o estado Americano decreta a “Lei Seca” que teve duração de quase 12 anos, proibindo a fabricação, venda, troca, transporte, importação, exportação, distribuição, posse e consumo de bebida alcoólica, o que foi considerada por muitos um desastre para a saúde pública americana (TREASURY USES NEW SANCTIONS AUTHORITY TO COMBAT GLOBAL ILLICIT DRUG TRADE, 2021). Somente em 1952 o uso excessivo do álcool passou a ser tratado como doença (JEROME, 1993; VIALA-ARTIGUES; MECHETTI, 2003).

Em 1967, o conceito de alcoolismo foi incorporado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) à Classificação Internacional das Doenças (CID-8), a partir da 8ª Conferência Mundial da Saúde. No CID-8, os problemas relacionados ao uso de álcool foram inseridos dentro de uma categoria mais ampla de transtornos de personalidade e de

neuroses. Esses problemas foram divididos em três categorias: dependência, beber de forma episódica abusiva e beber de forma episódica habitual ou regular (CISA, 2015).

Conforme este contexto, a OMS passou a promover políticas públicas, através de coleta de dados epidemiológicos e estratégias de redução de consumo, uma vez que o uso do álcool é considerado um fenômeno social, representando um grave problema de saúde pública mundial, fato que tem despertado a atenção médica e sanitária de diversos países (VARGAS; OLIVEIRA; ARAÚJO, 2009). Dentre estes dados podemos destacar o consumo per capita de álcool por país (**Figura 1**), onde se percebe que ele é ainda consumindo globalmente e estima-se que indivíduos com idade de 15 anos ou mais consumiram em torno de 6,2 litros (L) de álcool puro (Equivalente a cerca de 13,5g por dia).



**Figura 1:** Estimativa do consumo per capita de álcool por país.

**Fonte:** OMS, 2014.

Segundo a OMS (2014) no Brasil, o consumo total estimado é equivalente a 8,7 L por pessoa, quantidade superior à média mundial. Estima-se que homens consumam 13,6 L por ano, e as mulheres, 4,2 L por ano. Quando são considerados apenas os indivíduos que consomem álcool, está média sobe para 15,1 L de álcool puro por pessoa (sendo mulheres 8,9 L e homens 19,6 L). As bebidas mais utilizadas no mundo são as destiladas



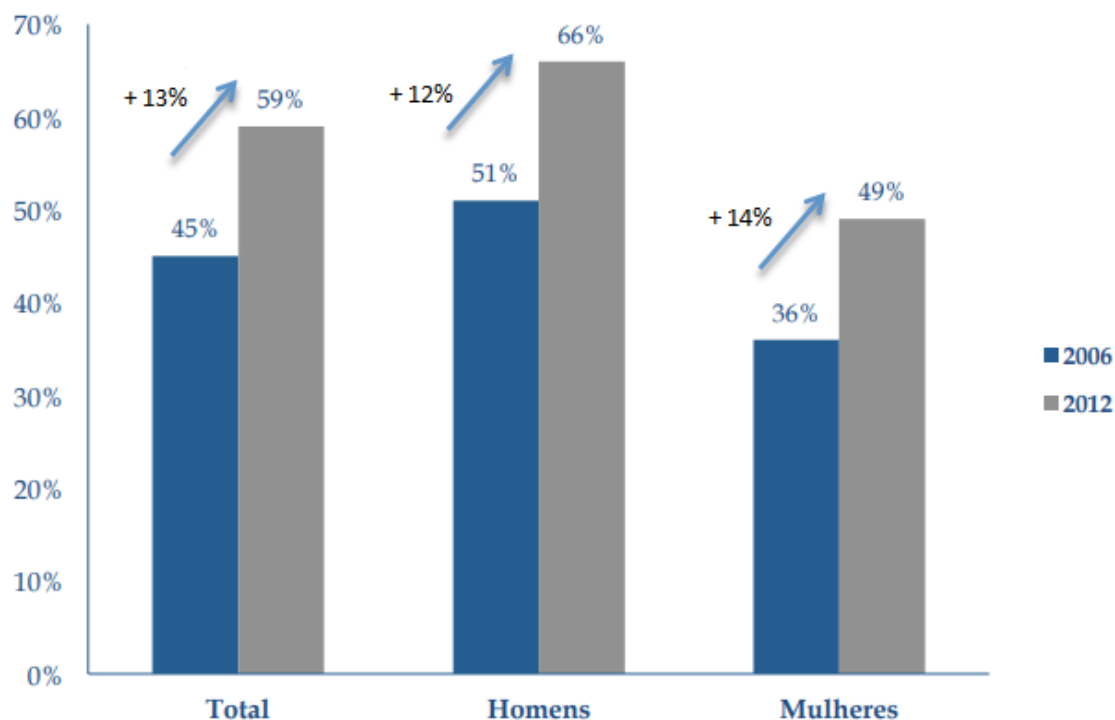
(50%), seguido de cerveja (35%) e vinho (8%). Na Região das Américas, a cerveja é o tipo mais consumido (55%), seguido dos destilados (32,6%) e do vinho (11,7%).

A partir destas informações verificou-se que o abuso do álcool, tanto em países desenvolvidos como nos países em desenvolvimento, tem alcançado grandes proporções e está associado a uma série de consequências adversas (KUNTSCHE; REHM; GMEL, 2004). Os desfechos negativos do uso abusivo de bebidas alcoólicas incluem desde alterações do humor até doenças cardiovasculares, doenças neurodegenerativas, gastrointestinais, hepáticas e mentais (OMS, 2004; GUERRA; ANTHONY, 2009). É certo também que o consumo de bebidas alcoólicas em grandes quantidades contribui de forma significativa na etiologia e manutenção de vários problemas sociais, econômicos e de saúde registrados no país, e alguns estudos mostram que o seu uso tem início cada vez mais cedo e com padrões diferentes de consumo (PINSKY et al., 2010).

## 1.2. PADRÃO DE CONSUMO *BINGE DRINKING*

No Brasil, o Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Políticas Públicas do Álcool e Outras Drogas (INPAD), realizou em 2013 o II Levantamento Nacional de Álcool e Drogas (LENAD) e avaliou o consumo de álcool no Brasil entre 2006 e 2012, no qual detectou um aumento de 13% em consumidores frequentes (que bebem uma vez por semana ou mais) e que o sexo feminino apresentou uma crescente de 14%. Além disso, beber em *binge*, que é considerado um indicador de beber de forma nociva, aumentou também de forma geral na população brasileira adulta feminina de 36% para 49% (**Figura 2**).

Estes dados se tornam ainda mais alarmante, pois segundo Caetano et al. (2011), grupos populacionais da faixa etária de 14-17, 18-29 e 30-39 anos no Brasil, isto é, jovens e adultos, apresentam um alto índice de consumo de álcool em *binge*, representando duas categorias alvos em políticas públicas de prevenção e tratamento, minimizando possíveis danos do alcoolismo.



**Figura 2** - Prevalência de consumo em *binge* em 2006 e 2012 entre adultos bebedores

Fonte: II LENAD, 2012

Conforme a quantidade e os aspectos temporais de consumo de álcool diferenciaram-se os conceitos de “alcoolismo” ou dependência alcoólica, em outras formas de uso como de beber de forma intermitente e episódica (*binge drinking*). O termo “*binge*” originou-se como uma descrição clínica de pacientes usuários de álcool que bebiam de forma pesada por um período de tempo, seguida por um período de abstinência (COURTNEY; POLICH, 2009; TOMSOVIC, 1974).

A quantidade que define essa prática, segundo o National Institute on Alcohol and Alcoholism (NIAAA) dos Estados Unidos, é um padrão de concentração alcoólica sanguínea de 0,08 g/dL após consumo, isto corresponde ao uso de cinco ou mais doses de bebidas alcoólicas em uma única ocasião por homens ou quatro ou mais por mulheres, com períodos de abstinência entre os episódios independentemente da frequência de consumo (NIAAA, 2005). Este padrão de consumo de etanol pode acarretar uma série de consequências e alterações no sistema nervoso central (SNC) durante o neuromaturoação, que podem refletir em modificações comportamentais em adolescentes do sexo feminino, no qual áreas cerebrais parecem ser mais vulneráveis a estes efeitos, afetando as redes de interação do córtex pré-frontal (CPF) e o hipocampo (HIP).

### 1.3. MATURAÇÃO DO CÉREBRO ADOLESCENTE E REDE DE ORGANIZAÇÃO ANATOMO-FISIOLÓGICA DO CPF E HIP.

A adolescência é um período de transição da infância à fase adulta, onde existem evidências em humanos e animais que ocorrem modificações estruturais e fisiológicas importantes para a maturação cerebral. Estruturalmente, estudos de neuroimagens revelam que o desenvolvimento cerebral ocorre até o início da fase adulto-jovem, como aumento nos volumes da substância branca (rica em axônios e intensa mielinização) nas primeiras duas ou três décadas de vida, com maturação em tratos de associação na região frontal do SNC (LEBEL; BEAULIEU, 2011). Anormalidades nesta substância branca pode acarretar desordens psiquiátricas durante a adolescência como afetivas de ansiedade e cognição (PAUS; KESHAVAN; GIEDD, 2008).

O volume da substância cinzenta (rica em corpos celulares, conexões dendríticas e sinapses) atinge picos no meio ou no final da infância e diminui durante a adolescência (BLAKEMORE, 2012). Ou seja, durante a infância ocorre maior arborização dendrítica, e depois diminui em regiões somatossensoriais e no CPF na adolescência, qualquer alteração tardia nesta região demonstra sensibilidade ao ambiente (TAMNES et al., 2013).

Anatomicamente, o CPF, é uma área importante e de desenvolvimento tardio no adolescente presente no lobo frontal do cérebro, delimitado pelo giro frontal superior, médio e inferior, bem como dividido em duas regiões com funções diferentes nos seres humanos: o CPF lateral (CPF dorsolateral e ventrolateral) associados a memória de trabalho e/ou inabilidade de execução de tarefas (HATHAWAY; NEWTON, 2020). A outra região é o CPF ventromedial (chamado de CPF orbitofrontal) associados a falta de discernimento, labilidade emocional e afetividade inapropriada, muito comum em jovens consumidores de drogas de abuso (HATHAWAY; NEWTON, 2020).

Adicionalmente, a puberdade pode influenciar no desenvolvimento estrutural do cérebro adolescente e em suas conexões com o CPF. De acordo com o estudo de Goddings et al. (2014), em indivíduos de 7 a 19 anos de ambos os sexos, há a influência da puberdade no controle estrutural de volume de áreas como amígdala, HIP e putâmen, bem como de maneira interativa com a puberdade através da idade produz efeitos no volume de forma significativa no *nucleus accumbens* e globo pálido em ambos os sexos.

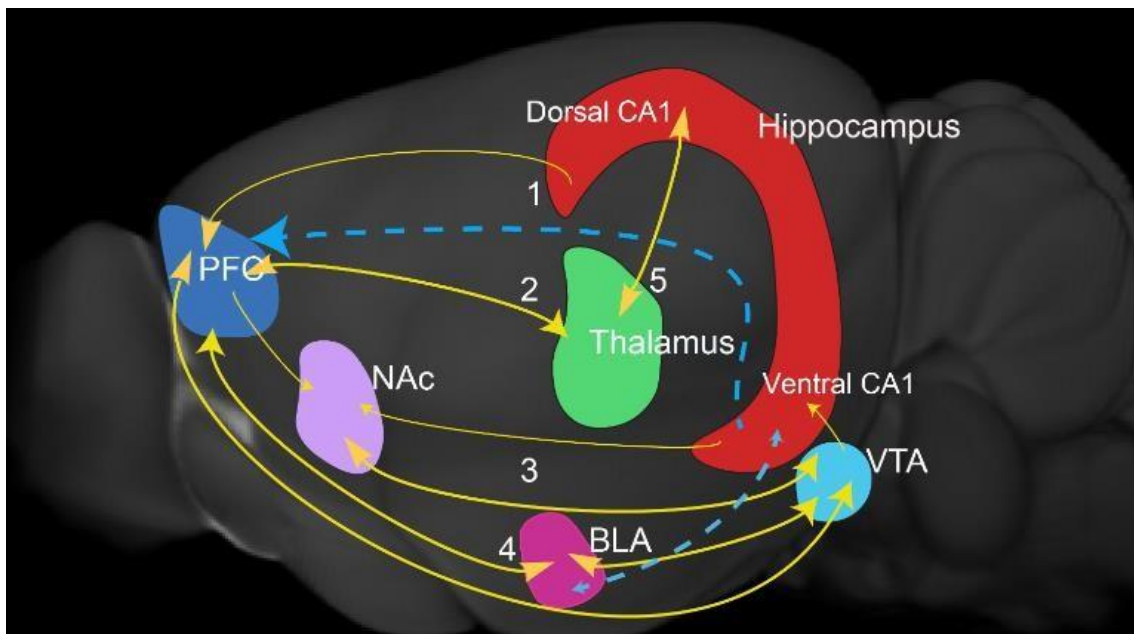
Fisiologicamente, algumas características são importantes no cérebro adolescente como a maturação de redes neurais que controlam funções executivas e sociais realizadas pelo CPF. Neste sentido, podemos mencionar redes de controle cognitivo realizado pela região lateral do CPF e regiões corticais do lobo parietal, que pode estar ativa ou inativa conforme ao avançar da idade mediando o comportamento de autocontrole de jovens, em contextos diferentes como afetividade ou recompensa (CRONE; DAHL, 2012). Além disso, a região medial do CPF com o avançar da idade diminui sua ativação, o que influencia no contexto sócio-afetivo do adolescente para a tomada de decisões (MILLS et al., 2014).

Outra estrutura anatômica e redes de conexões importantes nos jovens é o sistema límbico, formado por regiões corticais e profundas (TORRICO; ABDIJADID, 2019). Corticalmente, é formado por giro cingulado, giro para-hipocampal, giro orbitofrontal medial e presentes nos polos temporais em ambos os hemisférios e anteriormente ao córtex da ínsula (HAYDEN; PLATT, 2010). Profundamente, as regiões principais são o HIP, a amígdala, córtex olfatório, o diencéfalo (representado pelo tálamo) e os núcleos da base (TORRICO; ABDIJADID, 2019). O HIP, continua-se no giro para-hipocampal chegando ao lobo temporal medial formando o giro denteado, HIP e subículo que são importantes para a formação de memória (SQUIRE, 1992). Tal configuração, do HIP permite uma disposição que lembra uma cabeça e uma cauda, sendo a região da cabeça correlacionando-se ao *Núcleo accumbens (NAc)* e a cauda correlacionando-se ao corpo amigdalóide que contém a amígdala envolvido em respostas comportamentais de emocionalidade (SQUIRE, 1992).

Destaca-se, também no sistema límbico, o *striatum* que está presente nos núcleos da base, e juntamente com a amígdala apresenta conexões como CPF que normalmente apresenta picos de ativação durante a adolescência quando são estimulados ambientalmente por contextos de recompensa ou são apresentados a estímulos emocionais ao atingir a vida adulta. Esta ativação tende a se tornar mais específica no início da vida adulta ou diminuir tardiamente conforme maturação (DUMONTHEIL et al., 2010). O desenvolvimento do CPF consiste em “elemento chave” no adolescente para o controle de funções executivas (planejamento motor, capacidade de ações, busca de objetivos, memória de trabalho e controle cognitivo) (JOHNSON, 1995; TANG; SHAFER; OFEN, 2017), sendo significativo na infância e refinados na adolescência (SIMMONDS; HALLQUIST; LUNA, 2017). Porém, para isto ocorrer é necessário uma

integração e maturação prolongada com o HIP, juntamente com sistema límbico (MURTY; CALABRO; LUNA, 2016), fato que pode estar ocorrendo até a fase adulta.

A conectividade, entre CPF e HIP é uma importante via de integração do adolescente, pois já se sabe que durante a maturação desta via até a fase adulto-jovem pode ocorrer manutenção da memória de trabalho (SHAFER; OFEN, 2017), controle das emoções negativas que podem estar envolvidos na ansiedade, depressão e em situações estressoras (D'ARBELOFF et al., 2018). Além disso, estudos em animais demonstram que esta integração com o HIP aumenta a neurotransmissão dopaminérgica e glutamatérgica que aumenta a capacidade de plasticidade destes roedores (FUJISAWA; BUZSÁKI, 2011). Estas conexões podem ser monossinápticas e polissinápticas que estão presentes tanto em roedores, primatas e seres humanos (**Figura 3**). Podemos observar que: (1) Existem projeções do HIP dorsal (dHIP) e HIP ventral (vHIP) pelo Corno de Amon 1 (CA1) para o córtex pré-frontal medial (mPFC) por vias pré-límbicas e infra límbicas; (2) O mPFC atua indiretamente no dHIP por estruturas de retransmissão para o tálamo, via o núcleo accumbens através de projeções monossinápticas excitatórias para os dendritos distais em neurônios em CA1 de forma recíproca, que pode estar envolvida na formação de memória de trabalho; (3) Alça HIP-núcleo accumbens (NAc)-Área Tegmental Ventral (VTA) e mPFC, via está envolvida na formação de aprendizado dependente de HIP e regula a transição da memória de curto prazo no HIP para memória de longo-prazo no mPFC; (4) alça mPFC-núcleo basolateral da amígdala (BLA)-vHIP está envolvido na ansiedade, memória associado ao medo e ao comportamento social (importante durante a adolescência); e (5) Alça mPFC-tálamo-HIP está envolvida no processamento e ritmo neuronal rápido na camada I do mPFC contribuindo para o estado de atenção e de memória durante atividades persistentes. Ou seja, a compreensão da organização do CPF e HIP e suas funcionalidades é de extrema importância, pois qualquer interferência nesta conectividade e pode resultar em modificações comportamentais, seja por vias de dano oxidativo ou por alterações eletrofisiológicas, que podem resultar do uso de drogas de abuso como o etanol (ALLEN MOUSE BRAIN ATLAS, 2022).

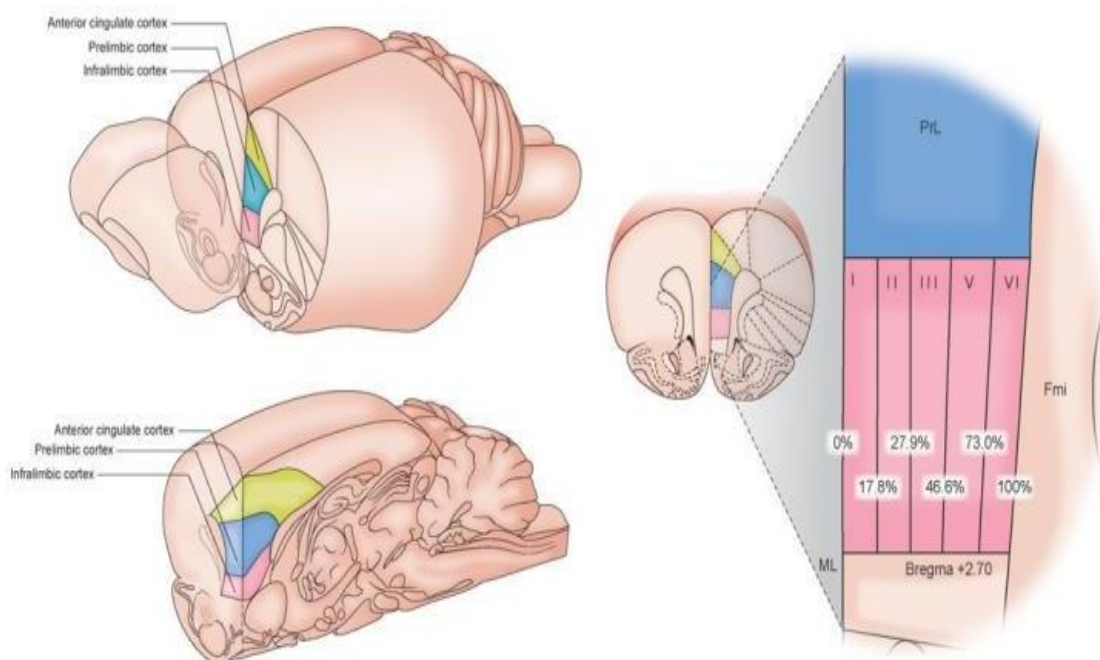


**Figura 3:** Neurocircuitos entre CPF e HIP

**Fonte:** Adaptado de ALLEN INSTITUTE FOR BRAIN SCIENCE. ALLEN MOUSE BRAIN ATLAS; 2022.

#### 1.4. ORGANIZAÇÃO E TIPOS DE CÉLULAS NO CPF

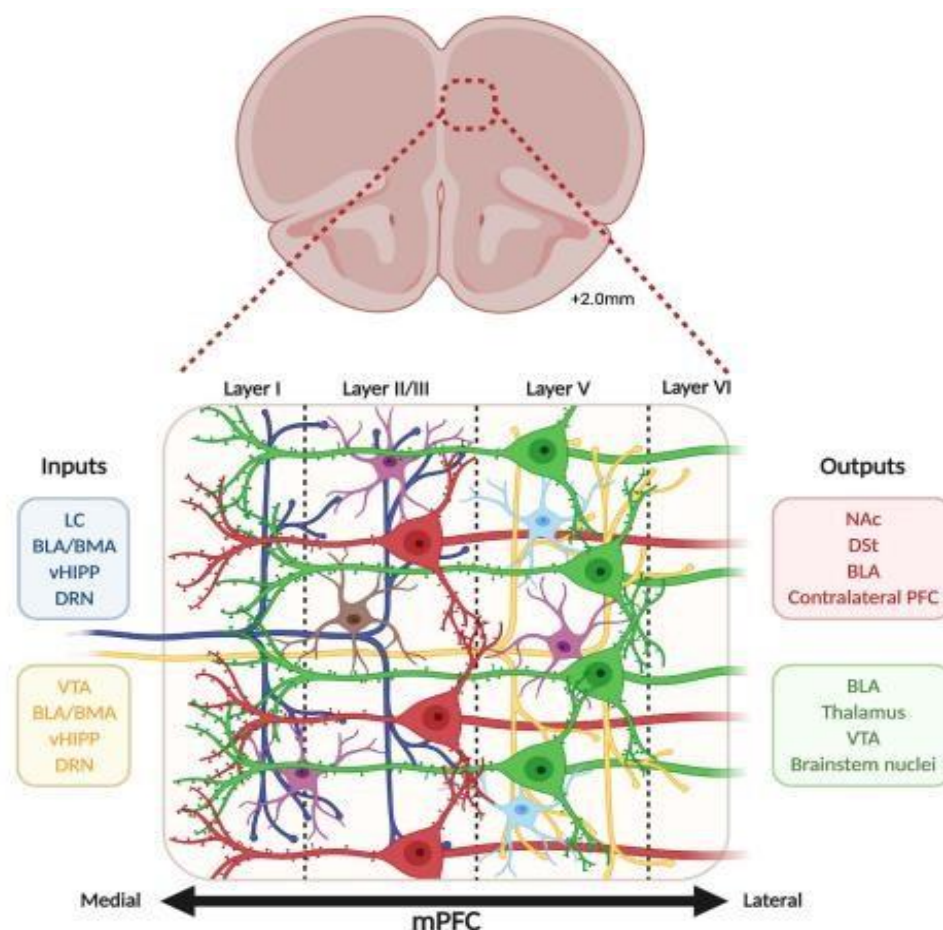
Ao considerarmos a estruturação do mPFC em seres humanos, este é organizado em regiões dorsal e ventral que basicamente emergem do córtex cingulado (dorsal, anterior e sugenual). Nos roedores, a parte dorsal é conhecida como córtex pré-frontal dorso medial (dmPFC), que se relaciona com o córtex cingulado anterior (ACC) e com a área motora secundária (M2). Enquanto a parte ventral, é conhecida como cortex pré-frontal ventromedial (vmPFC), que inclui córtex pré-límbico (PLC) e infralímbico (ILC) (HEIDBREDEDER; GROENEWEGEN, 2003). Ao observamos em regiões profundas do mPFC, especificamente em regiões ILC, existe uma organização laminar em 6 camadas (I à VI) para humanos, enquanto para roedores não existe a camada IV (UYLINGS; GROENEWEGEN; KOLB, 2003) (**Figura 4**).



**Figura 4-** Organização do mPFC e camadas

**Fonte:** UYLINGS; GROENEWEGEN; KOLB, 2003

Nestas camadas é possível encontrar dois tipos celulares distribuídos de maneira heterogênea, como neurônios piramidais excitatórios (80-90%) nas camadas II/III, IV, V e VI; e a presença de interneurônios inibitórios GABAérgicos (10-20%) nas camadas II/III e V (DOUGLAS; MARTIN, 2004; RUDY et al., 2011). Os neurônios piramidais ativam a excitabilidade via a produção de glutamato (GLUT) e expressão proteínas quinases dependentes de  $Ca^{+2}$ , como Quinase II Calmodulina/ $Ca^{+2}$  por receptores glutamatérgicos do tipo metabotrópicos (mGLUT) (WANG et al., 2013). Por outro lado, os interneurônios GABA podem ser classificados em 3 classes que co-expressam a proteína de ligação ao cálcio parvalbumina (PV, 40%), o neuropeptídeo somatostatina (SST, 30%), ou o peptídeo intestinal vasoativo (VIP, 30%) (RUDY et al., 2011). Conforme a **figura 5**, podemos observar que a camada I é medial (superficial) e a camada VI é lateral (profunda), os neurônios piramidais glutamatérgicos estão representados pela cor vermelha (camada II/III) e verde (camada V).



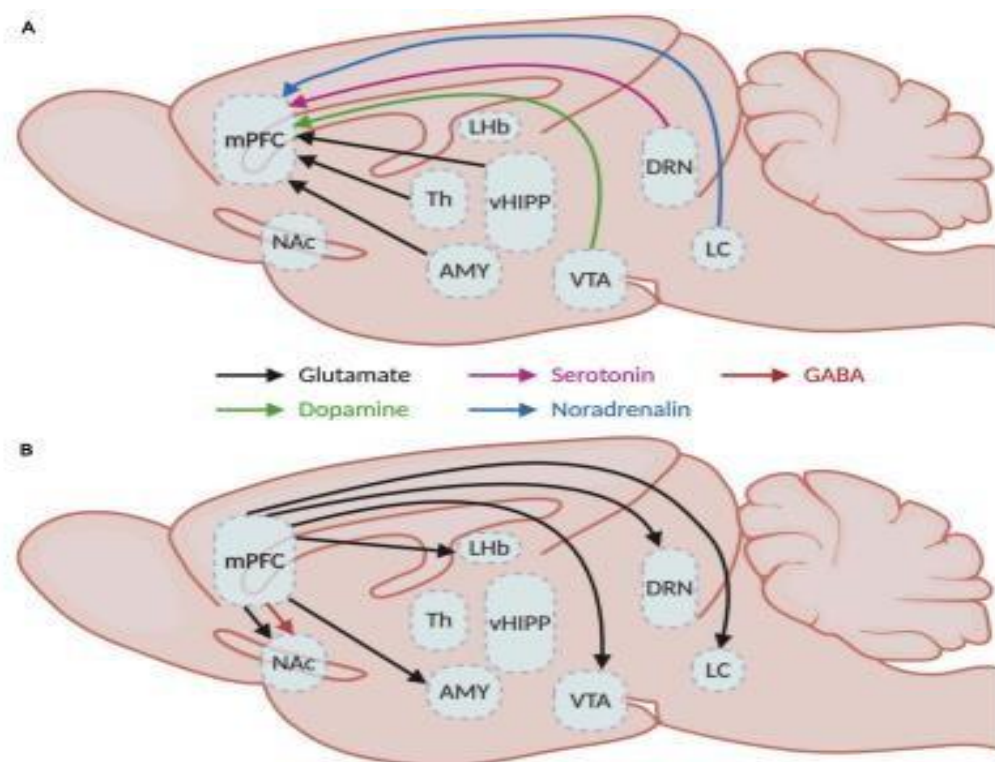
**Figura 5:** Organização das camadas no mPFC

**Fonte:** BITTAR; LABONTÉ, 2021

Na camada V, podemos encontrar ainda os interneurônios inibitórios (Ricos em neurotransmissão GABA) que possuem papel integrador com os neurônios piramidais no controle de disparos ou estímulos rápidos para outras regiões que realizam interconexões com mPFC, entre estes interneurônios podemos destacar: neurônios enriquecidos com somatostatina (cor lilás-camadas II/III e V), parvalbumina (cor azul claro – camada V) e peptídeo intestinal vasoativo (cor marrom-camada II/III). Vale ressaltar que a maioria das projeções que o mPFC recebe são aferentes para as camadas superficiais I e II/III, porém as camadas mais profundas V e VI recebem aferências corticais e sub-corticais de longo alcance (DOUGLAS; MARTIN, 2004). Em azul escuro e amarelo para as camadas I e II/III superficiais, bem como V e VI profundas é observado as vias aferentes vindas do Locus Coeruleus (LC), VTA e HIP; e em vermelho as vias eferentes de camadas superficiais e profundas.



Estas redes de conexão são reguladas por três principais vias fisiológicas aferentes (**Figura 6A**): glutamatérgicas, dopaminérgicas e GABAérgicas. As vias glutamatérgicas podem ocorrer bidirecionalmente entre o mPFC e HIP e com projeções para VTA e NAc, bem como para a amígdala. As vias dopaminérgicas se constituem basicamente para vias mesocorticolímbicas como VTA e NAc, VTA e CPF e de VTA para HIP. Além disso, citamos as vias serotoninérgicas do núcleo dorsal da rafe e noradrenérgicas do LC, além de outras vias eferentes oriundas do mPFC (**Figura 6B**).



**Figura 06:** Vias aferentes mPFC (A) e eferentes (B)

**Fonte:** BITTAR; LABONTÉ, 2021

Percebe-se que o mPFC é primordial para regulação das modificações comportamentais nos jovens, e é possível que interferências nestas conectividades pelo uso de drogas de abuso pode disparar múltiplas alterações de ansiedade, motora e cognitivas. Além disso, podemos reiterar que devido a esta organização difusa, é provável que a “força sináptica” destas vias seja de menor intensidade, porém a ritmicidade de disparos é crucial para a manutenção de plasticidade sináptica, como na formação de potenciação de longo-prazo (LTP). Adicionalmente, outra estrutura importante para

esclarecimento organizacional é o HIP, que está envolvido na formação de memória e dependendo da região, como mencionado anteriormente com a ansiedade.

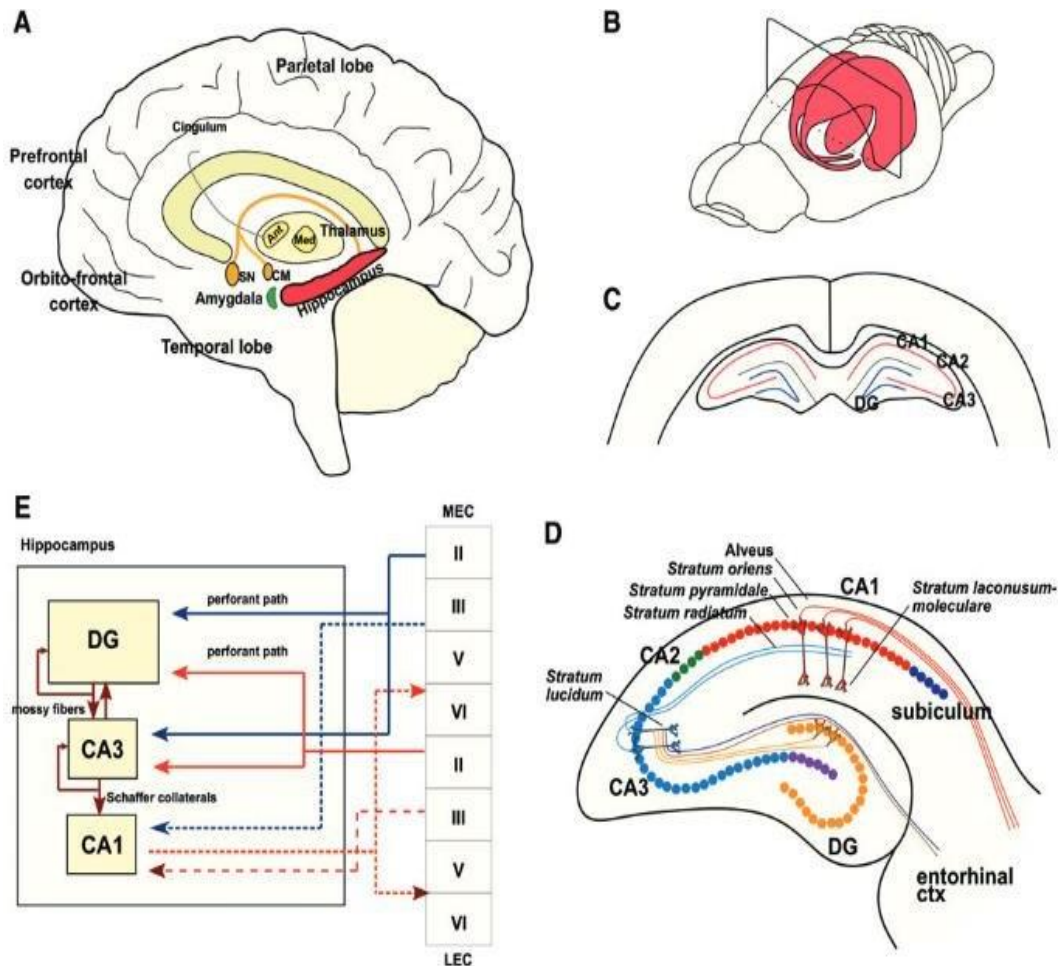
### 1.5. ORGANIZAÇÃO E NEUROCIRCUITARIA DO HIP.

O HIP, assim como o CPF, está envolvido da modulação de comportamento emocional (ansiedade) e de forma mais consolidada na capacidade de aprendizagem e em diferentes memórias em ambos humanos e animais (BANNERMAN et al., 2004; SEKERES; WINOCUR; MOSCOVITCH, 2018) durante o desenvolvimento cerebral como de jovens (XIE et al., 2021). Tais aspectos de emocionalidade e memórias, como aversivas, espacial e de reconhecimento de objeto, dependem de diferentes regiões anatômicas (COHEN; STACKMAN JR., 2015) e de potenciais eletrofisiológicos para construção e processamento destas informações que são regulados por modificação de forças sinápticas, que podem ocorrer pela formação da potenciação de longo-prazo conhecido como LTP (principalmente por receptores ionotrópicos NMDA-AMPA), e ocorre de maneira diferente em relação ao mPFC (principalmente por receptores metabotrópicos mGLUT) (BALTACI; MOGULKOC; BALTACI, 2018).

Em animais, como em roedores, o HIP é dividido em dHIP e vHIP (FANSELOW; DONG, 2010). A porção dorsal, como mostrado anteriormente recebe conexões mais corticais como da região visual, auditiva e sensoriais oriundas do córtex entorrinal (do inglês entorrinal cortex-EC) medial, sugerindo seu envolvimento na codificação da memória espacial (SIGURDSSON; DUVARCI, 2016). A porção ventral, está associado à amígdala e ao próprio mPFC, envolvido na modulação de aspectos de emocionalidade como a ansiedade e até mesmo depressão (STRANGE et al., 2014).

Em relação à citoarquitetura destas regiões, HIP de uma maneira geral é organizado em CA1, corno de Amon 2 (CA2), corno de Amon (CA3) e giro denteado (do inglês dentate gyrus-DG) (STELLA et al., 2012) (**Figura 7**). Desta forma, apresenta uma organização tri-sináptica, onde o EC consiste na primeira interconexão com o HIP, partindo projeções da via perforante para o DG (feixes sinápticos de cor azul na **figura 7E** e **7D**), via camada II (rica em células granulares- **figura 7D** – círculo escuro) e por conseguinte se projeta a CA3 (sinapses de seta de cor vermelha escuro) pelas fibras

musgosas (cor vermelha na **figura 7E** e feixes alaranjados na **figura 7D**) (TEMIDO-FERREIRA et al., 2019)



**Figura 07:** Organização e neurocircuitaria hipocampal

**Fonte:** TEMIDO-FERREIRA et al., 2019.

As conexões com os neurônios piramidais (excitatórios por via glutamatérgica ionotrópica), ocorre entre nas regiões CA3 e CA1 pela via colateral de Schaffer (SAUDARGIENE; COBB; GRAHAM, 2014) (feixes de cor azul claro -**figura 7D** e setas de cor vermelho-**figura 7E**, presentes no *stratum lucidum* (neurônios piramidais no círculo alaranjado – **figura 7D**) e se projetam do CA1 para a EC através da via temporoamônica (feixes de cor vermelho-**figura 7D**). Neurônios piramidais presentes no *stratum radiatum* e *stratum oriens* (40% de dendritos), bem como no *stratum lacunosus-molecular* (20% de dendritos-círculo verde -**figura 7D**) apresentam maior força sináptica,

pois possuem sinapses excitatórias glutamatérgicas proporcionalmente maiores que as inibitórias GABAérgicas, desta forma se conectando com diferentes regiões corticais e subcorticais, como amígdala e o mPFC envolvidos na excitabilidade e plasticidade (ERMINE, 2006).

Estes mecanismos de excitabilidade e plasticidade neuronal, podem estar envolvidos em possíveis danos de maturação do cérebro adolescente que podem afetar a neurocircuitaria e na sinalização molecular via disfunções nos LTP, que como mencionado anteriormente, podem funcionar de forma diferente entre mPFC e as diferentes regiões do HIP.

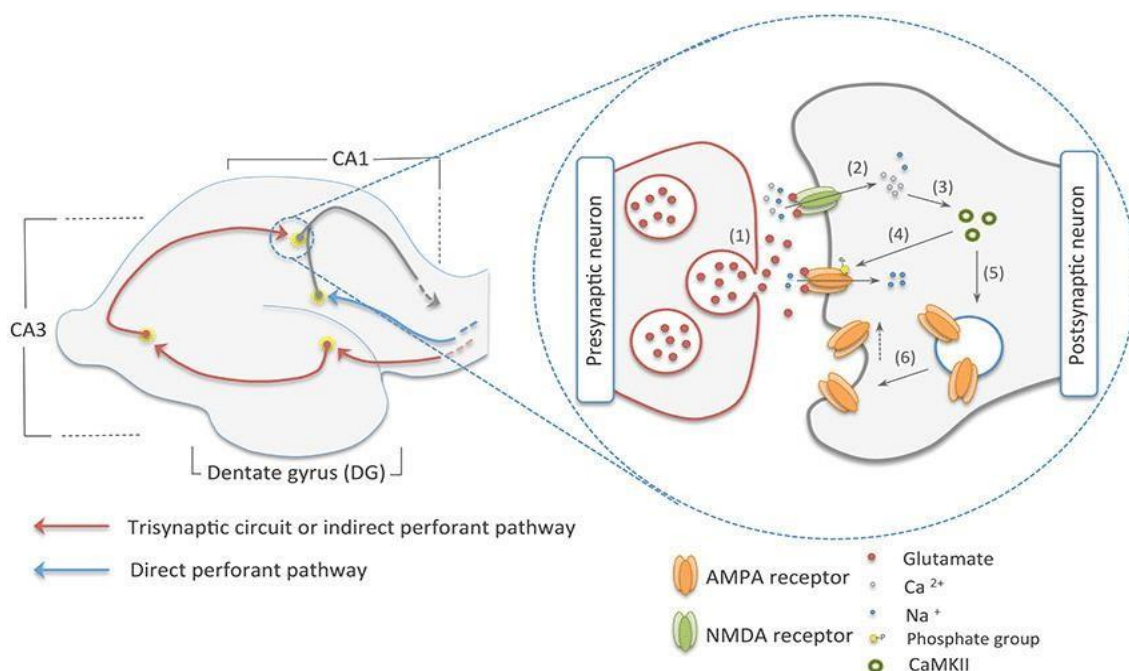
## 1.6. PLASTICIDADE E MECANISMOS DE FORMAÇÃO DE LTP

A plasticidade consiste em uma atividade neuronal que depende de modificações na eficácia e na força de transmissão sináptica já existentes, e podem ser formados em questões de minutos há vários dias e até mesmo por anos, estando correlacionado com a formação de vias canônicas da formação de memória e outras vias neurofisiológicas (CITRI; MALENKA, 2008). Estas formações neuroplásticas e conseqüentemente de memória, dependem de inúmeras mudanças estruturais e funcionais, bem como na força sináptica em diferentes regiões do SNC (FERNANDES; CARVALHO, 2016).

As principais mudanças podem ocorrer de forma dependente da estimulação, ou seja, da excitabilidade, destacando-se a curto prazo e/ou longo prazo alterações no sistema de proteínas pré-existentes na síntese de novas proteínas, que pode se manter sustentada a partir de fatores transcripcionais que podem potencializar a força sináptica (LTP) ou decair este fortalecimento (do inglês long-term depression-LTD) (BECKER; TETZLAFF, 2021). Para melhor compreensão, destacamos aqui neste trabalho as vias do LTP, como aspectos das sinapses excitatórias glutamatérgicas, divididas em duas fases: inicial e tardia.

Na LTP inicial ocorre liberação de GLUT nas sinapses excitatórias (**etapa 1**), para atuação deste neurotransmissor sobre os receptores que coexistem nos terminais pós-sinápticos chamados de ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico (AMPA) e N-metil-D-aspartato (NMDA). estes receptores regulam o influxo de íons como  $\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}^{+2}$  e efluxo de  $\text{K}^+$ . A atuação do GLUT ocorre em ambos os receptores,

somente o AMPA ativado em estímulos considerados fracos, o que permite sua abertura e influxo de  $\text{Na}^+$  gerando uma leve despolarização no neurônio. Enquanto, isso o receptor NMDA permanece fechado, pois seu sistema de comporta encontra-se bloqueado por íon  $\text{Mg}^{+2}$ . Na persistência da despolarização ocorre o desbloqueio do receptor NMDA, o que acarreta no influxo de  $\text{Ca}^{+2}$  para o meio intracelular (**etapa 2**), e consequentemente aumenta a síntese de proteínas quinases II dependentes de  $\text{Ca}^{+2}$ /Calmodulina (CAMKII) (**etapa 3**), promovendo maior inserção de receptores AMPA (**etapa 5 e 6**) e gerando desta forma uma despolarização sustentada por meio de potencial excitatório pós-sináptico conhecido na sigla em inglês EPSP e induzindo o chamado LTP. Um exemplo disto, ocorre nas conexões tri-sinápticas do HIP entre CA1 e CA3 (Figura 8; PONTES; DE SOUSA, 2016).

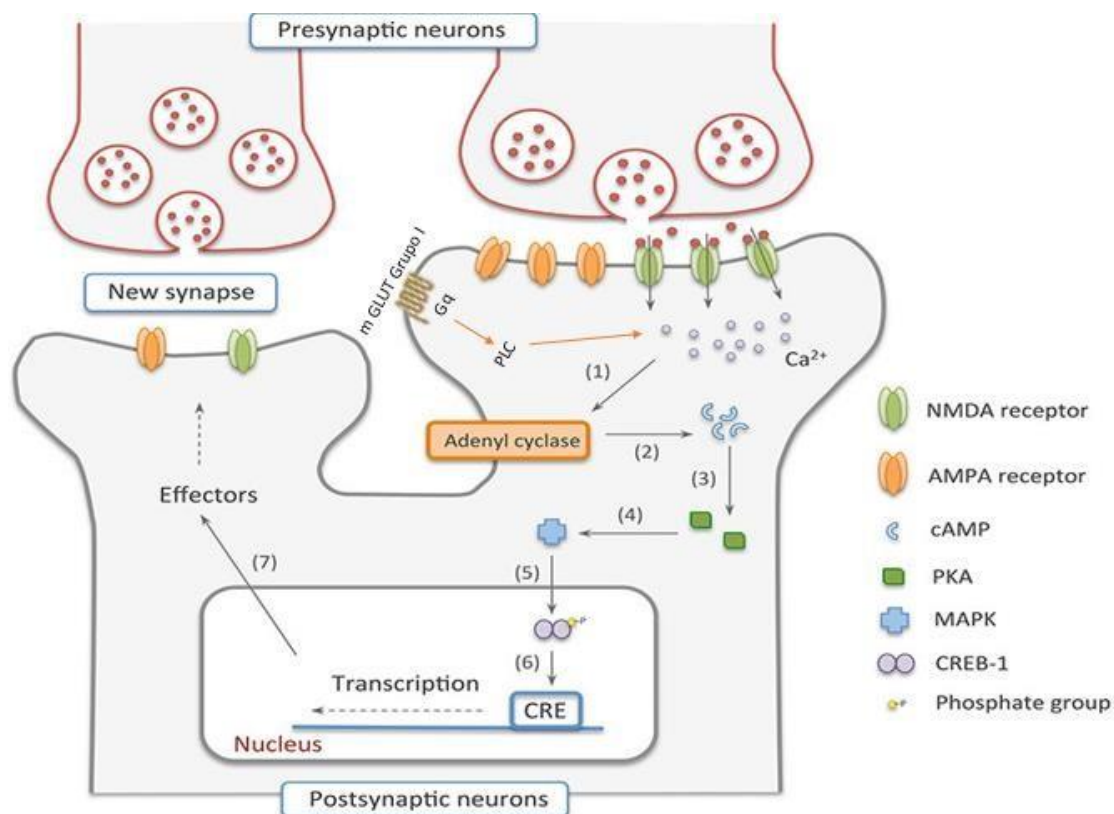


**Figura 8:** Mecanismo de fase inicial de LTP

**Fonte:** PONTES; DE SOUSA, 2016.

Na fase tardia, ocorre de maneira dependente de fatores transcricionais gênicos e na síntese de proteínas, como CAMKII (**etapa 1**), sistema de quinases como proteína quinase A (PKA) (**etapa 3**), regulado pela ativação da adenilil ciclase e adenosina monofosfato cíclico (cAMP) (**etapa 2**). Outra quinase importante é a proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK) (**etapa 4**), leva a formação de genes de resposta imediata como fatores de transcrição como o fator de transcrição proteína ligante ao elemento

responsivo de cAMP (CREB), desta forma promovendo estímulos excitatórios simultaneamente, sustentados e persistentes tornando a sinapse mais eficiente e aumentando a densidade dendrítica (**etapa 7**), favorecendo a plasticidade sináptica e também formação de memória. Além disso, outros receptores metabotrópicos do grupo I do glutamato (mGLUT1 e mGLUT5) (**setas alaranjadas**), podem favorecer ambos os processos iniciais e tardios de formação de LTP (**Figura 9**; PONTES; DE SOUSA, 2016).



**Figura 9:** Mecanismo de fase tardia de LTP

**Fonte:** PONTES; DE SOUSA, 2016.

A compreensão de todos estes aspectos de neurodesenvolvimento do cérebro adolescente, neurocircuitarias envolvendo o CPF e o HIP, citoarquitetura destas áreas e formação de LTP permite um conhecimento sustentado e suficiente para entendimento de diferentes mecanismos de toxicidade em padrão *binge* de consumo por etanol, tais como vias por estresse oxidativo, modificações de LTP e mudanças comportamentais.

## 1.7. ALTERAÇÕES NO SNC INDUZIDOS EM PADRÃO *BINGE* DRINKING DE ETANOL

As alterações no sistema nervoso devem levar em consideração a transição entre estágios iniciais de desenvolvimento, como a adolescência até a fase adulta, nos seres humanos, que requer maturidades físicas e comportamentais. De fato, o cérebro passa por diferentes fases de mudança funcional e estrutural, destacando-se como fase crítica a adolescência em comparação com o cérebro adulto, no qual o cérebro adolescente é particularmente sensível a certos efeitos do álcool (BARRON et al., 2005).

Evidências demonstram que o etanol induz anormalidades estruturais como na redução de volumes do putâmen e talâmo (FEIN et al., 2013), reduções bilaterais no HIP e volumes dos lobos frontais, diminuição da difusividade significativa do corpo caloso (DE BELLIS et al., 2000, 2005, 2008) e aumento das atividades parietais durante uma tarefa que necessita o uso de memória espacial (TAPERT; CALDWELL; BURKE, 2004). Além disso, o padrão de consumo *binge* compromete a substância branca das regiões parietais, temporais, cerebelares e frontais (MCQUEENY et al., 2009), induz redução do volume cerebelar (LISDAHL et al., 2013), mudanças corticais (SQUEGLIA et al., 2012) e redução na integridade entre as fibras nervosas de conexão entre a corona radiada e a substância branca (JACOBUS; TAPERT, 2013).

Ao se comparar os danos induzidos por etanol em padrão *binge* entre gêneros masculino e femininos na fase de adolescência, alguns estudos apontam que fêmeas são mais sensíveis ao consumo excessivo de etanol. Estudos de imagem demonstram que há diferenças morfométricas no encéfalo em áreas esquerdas do CPF, que estão associados às funções executivas, de alerta e viso espacial alteradas em função do etanol (SQUEGLIA et al., 2012), mais vulneráveis a psicopatologias (STORR; PACEK; MARTINS, 2012) e alterações neurocognitivas (HOMMER, 2003). Ou seja, como mencionado anteriormente, essa maturação neuronal predispõe o SNC a consequências prejudiciais de drogas psicotrópicas, ocasionando ansiedade, déficits cognitivos e alterações motoras (CREWS; HE; HODGE, 2007; SLAWECKI; BETANCOURT, 2002).



Estas alterações comportamentais em adolescentes ocasionados pelo consumo de etanol podem ser decorrentes de distúrbios na homeostase de diversas regiões cerebrais, como CPF, HIP e sistema límbico, o que agrava o comportamento de risco do adolescente (GIEDD, 2008). Além disso, o etanol também afeta negativamente a via mesocorticolímbica, que tem sido relacionada aos circuitos de recompensa e reforço. A ativação da sinalização do sistema dopaminérgico na VTA e no NAc, concomitante à hiperativação do sistema glutamatérgico em estruturas límbicas, desencadeia mecanismos de neurotoxicidade e alterações comportamentais principalmente no cérebro imaturo (ENGEL; JERLHAG, 2014; PASCUAL et al., 2009).

Nosso grupo demonstrou que o paradigma de *binge drinking* desde a adolescência até a idade adulta em modelos animais induz às alterações emocionais e motoras relacionadas ao dano oxidativo, bem como déficit cognitivo por disfunções do HIP e CPF (FERNANDES et al., 2018 a, b; OLIVEIRA et al., 2018; BELÉM-FILHO et al., 2018). No entanto, descobrimos que os efeitos deletérios do consumo excessivo de álcool não se restringem ao SNC. Na verdade, descobrimos que o sistema estomatognático também pode ser severamente afetado pelo padrão de consumo excessivo de álcool (MAIA et al., 2020 – **ANEXO A**; FRAZÃO et al., 2020; FERREIRA et al., 2021). Nesse contexto, os custos do consumo habitual do *binge drinking* são consideráveis, tanto pelos aspectos econômicos como sociais e emocionais (HECKMANN; SILVEIRA, 2009), e deve-se considerar as características farmacológicas e toxicológicas do etanol para melhor compreensão destas alterações.

## 1.8. VIAS DE ALTERAÇÕES INDUZIDAS POR ETANOL

### 1.8.1. Farmacocinética e metabolismo oxidativo do etanol

O etanol é uma substância psicotrópica depressora do SNC, normalmente encontrado em bebidas, como vinho e cervejas. Consiste em uma cadeia de dois carbonos e um grupo hidroxila que confere um balanço hidrofílico-hidrofóbico e possui um baixo peso-molecular permitindo uma partição por inúmeros fluidos e tecidos corporais difundindo-se e sendo distribuído, principalmente, pelo SNC (COSTARDI et al., 2015).



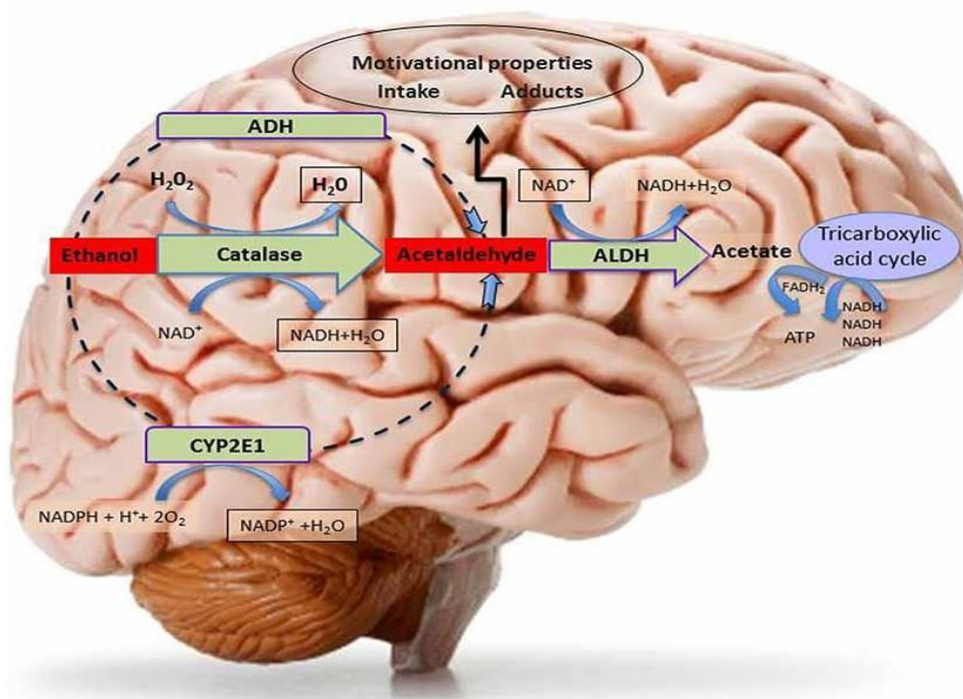
O etanol quando consumido é rapidamente absorvido pelo trato-gastrointestinal, e sua concentração alcoólica plasmática máxima ocorre entre 10 e 60 min. Sua distribuição para compartimentos aquosos corporais ocorre em aproximadamente em 55-60% em homens não-obesos e em mulheres de 50-55%. Esta diferença ocorre devido as mulheres serem menores e por possuírem menor peso-corporal e mais tecido adiposo. Em homens e mulheres saudáveis, os volumes de distribuição são 0,69 L/kg e 0,60 L/kg, respectivamente, portanto se distribuindo de maneira rápida no sexo feminino (MASKELL et al., 2019). Estes valores podem variar conforme a idade, gênero e quantidade de tecido adiposo (JONES, 2019).

O fato de o etanol ser uma molécula pequena permite uma rápida distribuição para órgãos principais como coração, cérebro e músculos apresentando as mesmas concentrações, enquanto o fígado apresenta concentrações maiores por receber o fenômeno de absorção oriundo do estômago e intestino (NIAAA, 2015). O etanol ingerido é metabolizado principalmente no fígado, que é o tecido mais susceptível aos danos induzidos por esta molécula, porém este metabolismo também ocorre no SNC. Usualmente o metabolismo do etanol ocorre através de vias oxidativas e não-oxidativas (conjugação com glicuronídeos, formação de ésteres e fosfatidiletanol) (JIANG et al., 2020).

As vias oxidativas são consideradas as primeiras e principais etapas do metabolismo do etanol e envolvem a enzima álcool desidrogenase (ADH), o sistema de enzimas microsomal de oxidação (SEMO), como a enzima CYP2E1, e a participação da enzima catalase (CAT) que convertem o álcool em acetaldeído (metabólito tóxico ao organismo). Em seguida, o acetaldeído é transformado em acetato pela enzima presente em mitocôndrias chamada de aldeído desidrogenase (ALDH). O acetato formado pode participar de outros ciclos que podem alterar o estado redox, como ocorre na reoxidação de nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida (NADH) via cadeias transportadoras de elétrons gerando espécies reativas ao oxigênio (ERO), bem como o próprio acetato é capaz de promover danos no SNC após atingir a circulação sanguínea (ZAKHARI, 2013).

Inúmeros fatores podem influenciar no metabolismo do etanol, tais como idade, estrutura física, variabilidade e vulnerabilidade genética, estado de saúde, e padrão de consumo, acarretando desta forma diferentes formas de metabolização do etanol. Por exemplo, há variações da expressão genética da enzima ADH, que é menor no estômago

de mulheres comparado aos homens, promovendo rápida concentração sanguínea em consumos equivalentes (SEITZ et al., 1990). Essa expressão enzimática também é baixa no encéfalo, onde o metabolismo oxidativo apresenta maior ocorrência pelas enzimas CYP2E1 e CAT (Figura 10).



**Figura 10-** Metabolismo do etanol no SNC.

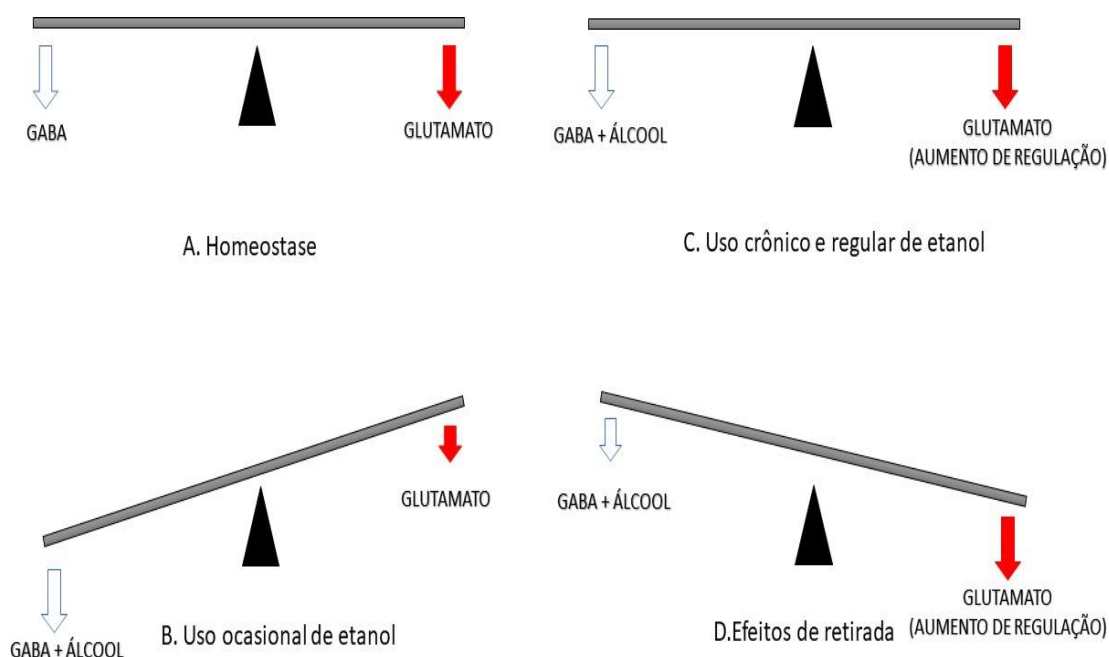
**Fonte:** PEANA et al., 2017.

No fígado os níveis de CYP2E1 podem ser induzidas por consumo crônico de etanol ou ainda em padrão de consumo intermitentes e episódica, que cooperam para hepatopatias (LU; CEDERBAUM, 2018). A CAT localizada em peroxissomos necessita de peróxido de hidrogênio sendo consumido na reação, sendo mais importante no encéfalo quando comparado ao fígado (ZIMATKIN et al., 2006). A eliminação do etanol pode variar conforme o padrão de consumo, sendo que um drinque por pessoa é removido por metabolismo oxidativo (95-98%) e menos que 10% eliminado pelos pulmões, rins e pele. Doses moderadas podem ser detectadas na urina, ar exalado e saliva em aproximadamente 2-5% durante 7h (JONES, 2019).

### 1.8.2 Vias toxicodinâmicas induzidas por etanol

Os danos anátomo-fisiológicos induzidos pelo etanol são decorrentes de mecanismos neurotóxicos que envolvem um balanço entre aminoácidos excitatórios e inibitórios e/ou liberação de monoaminas, bem como por alterações bioquímicas de fosforilação que podem estimular a liberação de mediadores inflamatórios que podem ocorrer de forma diferente em *binge* drinking ou alcoolismo crônico (WARD; LALLEMAND; DE WITTE, 2009).

O principal aminoácido inibitório é o GABA, que se liga aos receptores GABAérgicos provocando hiperpolarização da membrana celular e inibição da atividade neural. O etanol é capaz de modular a função GABA, de tal modo, que em certas regiões do cérebro aumenta a liberação do aminoácido inibitório através da inibição de sua degradação. Além disso, o etanol também altera as correntes iônicas que passam por GABA<sub>A</sub>, que é dependente do tempo de exposição e a concentração do agente tóxico (CARTA; MAMELI; VALENZUELA, 2004; SMITH, 2013) (**Figura 11**).



**Figura 11:** Balanço de neurotransmissores inibitórios (GABA) e excitatórios (GLUTAMATO) dependentes da exposição ao etanol como em **A**. Homeostase (ausência de álcool), **B**. Consumo casual ou padrão de estágios iniciais de intoxicação, **C**. Uso crônico e regular de etanol como no padrão de consumo intermitente e **D**. Ausência de etanol após consumo crônico e regular.

**Fonte:** Adaptado de BHARADWAJ; KATTIMANI, 2013.

No caso do aminoácido excitatório (por exemplo GLUT), o excesso de liberação pode provocar morte neuronal por duas vias. A priori, excitotoxicidade que ocorre pela ativação de receptores glutamatérgicos, aumentando o influxo de  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular mediado por receptores NMDA, gerando a formação de óxido nítrico (NO), aumento de influxo de  $\text{Na}^{+}$  (dependente de receptor AMPA), despolarização e colapso mitocondrial, e alterações dendríticas (GREENWOOD; CONNOLLY, 2007).

A outra via é a toxicidade oxidativa gerada pelo próprio GLUT, visto que este neurotransmissor é capaz de provocar uma série de distúrbios no balanço da homeostase redox da célula gerando uma série de EROs radicalares e não-radicalares. Nesta via de estresse oxidativo sabe-se que o etanol e seu metabólito acetaldeído podem atravessar a barreira hematoencefálica e provocar danos ao SNC. Além disso, o próprio etanol pode ser metabolizado no encéfalo devido a presença de sistemas enzimáticos como a CAT e a enzima CYP2E1 que podem promover acúmulo de tais espécies, como o ânion superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ); radical hidroxil (OH.); peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ); peróxidos lipídicos e espécies reativas de nitrogênio (ERNs), tais como peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ). Esse conjunto de moléculas reativas podem provocar danos celulares, proteicos, lipídicos e no DNA induzindo neurotoxicidade e neurodegeneração (HERNÁNDEZ; LÓPEZ-SÁNCHEZ; RENDÓN-RAMÍREZ, 2016).

Para evitar estes danos, o SNC ativa diferentes mecanismos antioxidantes que podem ser não-enzimáticos (principalmente por GSH) e enzimáticos que envolvam a superóxido dismutase (SOD). No SNC são encontrados dois tipos de SOD, uma na mitocôndria que é dependente de Mn e a outra no citoplasma, microsomas e sinaptossomas que são dependentes de Cu e Zn. A CAT no SNC é encontrada no citosol, microsomas, sinaptossomas e mitocôndria). A glutathiona peroxidase (GSH-Px) no SNC está presente nas células da glia e neurais. A glutathiona redutase (Gred) no SNC está presente no citosol e mitocôndria (HERNÁNDEZ; LÓPEZ-SÁNCHEZ; RENDÓN-RAMÍREZ, 2016).

Sabe-se que a ingestão de álcool é capaz de alterar estes mecanismos antioxidantes, com atuação direta sobre a redução de níveis plasmáticos ou séricos não-enzimáticos (via GSH), assim como altera atividades enzimáticas da SOD, CAT e GSH-Px (BARBOSA et al., 2010). Estes achados foram observados em nosso grupo de estudo,

como mencionado anteriormente (FERNANDES et al., 2018 a,b; OLIVEIRA et al., 2018; BELÉM-FILHO et al., 2018).

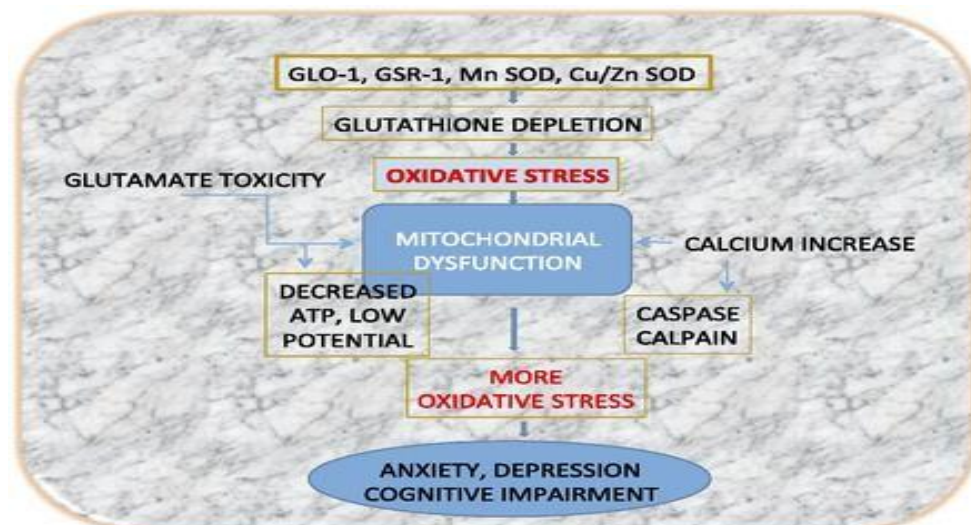
As EROs são consideradas elementos-chaves no desenvolvimento e funcionabilidade no neurônio, desde que estejam em quantidades baixas à moderadas, que em altas concentrações produzem danos sistêmicos (BARZILAI; YAMAMOTO, 2004). Outras espécies reativas a serem consideradas são NO e monóxido de carbono (CO) sendo fisiologicamente formados durante a formação de LTP através da enzima óxido nítrico sintase (NOS), que converte a arginina em NO, e consequentemente atua como mensageiro retrógrado ao neurônio pré-sináptico, estimulando a liberação de GLUT na formação de LTP (KOESLING et al., 2012), que ao invés de ser deletério produz maior estimulação de LTP.

Nos efeitos deletérios gerados pelo consumo de etanol, a produção de EROs em grandes concentrações acabam por diminuir o sistema de neutralização destes compostos, com depleção de GSH, SOD, CAT, com aumento de toxicidade por GLUT, ocorrendo extensa oxidação de proteínas e peroxidação lipídica (GRIENGLING et al., 2000; FIRUZI et al., 2011) (**Figura 12**). Todos estes eventos resultam em dano oxidativo, degeneração celular, declínio funcional, possivelmente interferindo na formação de LTP, sinalização sináptica, memória e outras vias que dependem do sistema glutamatérgico de transmissão, já explorados neste trabalho.

Vários estudos demonstram que áreas como CPF e o HIP são sensíveis ao estresse oxidativo (PATKI et al., 2014; SOLANKI et al., 2015). No caso do HIP, as células piramidais em CA3 e células granulares do DG são áreas propensas a um mecanismo pro-oxidativo fisiológico, pois estas conexões apresentam uma plasticidade e regeneração/remodelamento natural (McEWEN, 2008). Por outro lado, o CA1 é mais sensível às alterações oxidativas. Alterações na neurocircuitaria entre CA1 e CA3 das regiões hipocâmpais desencadeia diminuição da proliferação celular, incapacidade de remodelamento, ruptura de plasticidade sináptica e desregulação de neurotransmissores e alteração de fatores neurotróficos derivados do cérebro (BDNF) (WANG; MICHAELIS, 2010).

O estresse oxidativo no CPF induzidos pelo consumo de etanol resulta em alterações das espinhas e no crescimento dendrítico em situações de resposta estressoras (BROWN; HENNING; WELLMAN, 2005), o que possivelmente provoca mudanças na

citoarquitetura dendrítica e na conectividade neuronal do CPF com outras áreas (LISTON; MCEWEN; CASEY, 2009), promovendo alterações comportamentais.



Schematic representation of how oxidative stress might lead to cognitive and behavioral deficits

**Figure 12:** Representação de estresse oxidativo com alterações comportamentais e cognitivas.

Fonte: SALIM, 2016

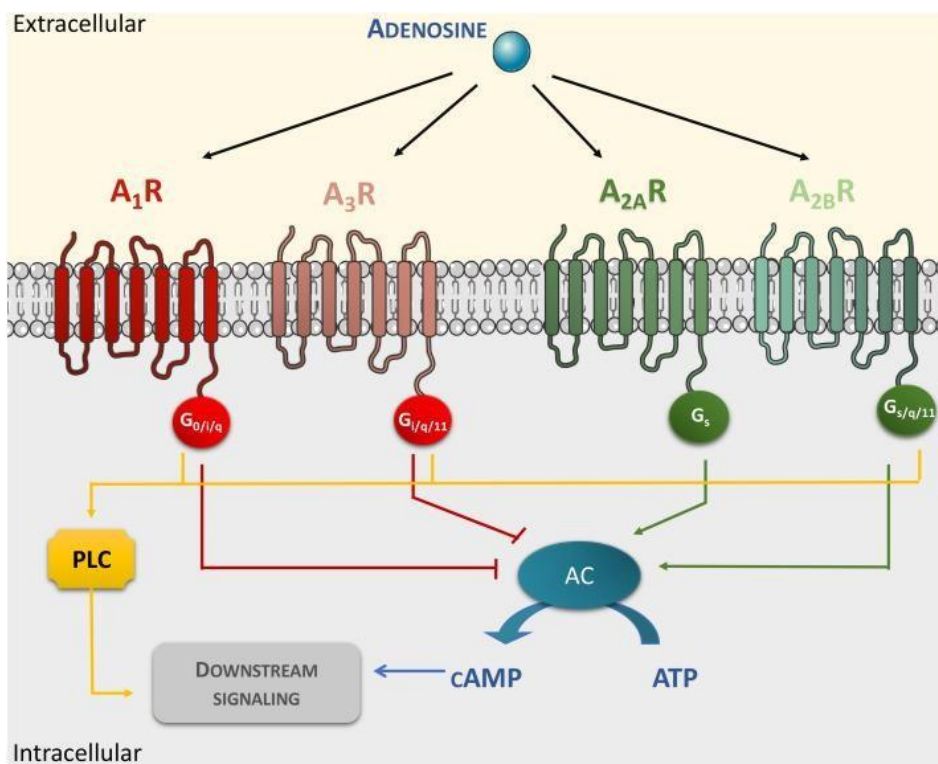
Outra via de alteração como na formação de LTP já foram descritas na literatura (KROENER et al., 2012). No estudo de KROENER et al. (2012), camundongos foram expostos ao vapor de etanol (15-17mg/litro de ar) ou a inalação de 16h/dia por 4 dias consecutivos e com abstinência de 8h, totalizando 3 ciclos consecutivos neste esquema de tratamento. Foi observado que o etanol aumentou a relação AMPA/NMDA ao analisar os cortes mPFC na camada V de neurônios piramidais de forma imediata ou dentro de 1 semana. Este aumento inesperado não foi mais observado após 1 semana, apesar da persistência de correntes sinápticas por NMDA, acarretando o aumento de LTP, e na inalteração de espinhas dendríticas basais nestes neurônios (KROENER et al., 2012).

No HIP, ratos expostos à dieta alcoólica por três períodos de 7 à 10 dias com intervalos de 3 dias demonstraram redução de LTP na porção ventral, na região CA1 da cápsula externa próxima a amígdala basolateral em simples e múltiplas retiradas, o que pode resultar em mudanças comportamentais do tipo ansiedade e medo. Por outro lado, a região dorsal entre CA1 e a fibras colaterais de Schaffer não apresentaram alterações (STEPHENS et al., 2005). Percebe-se que estas alterações induzidas por etanol são variáveis, pois pode depender da dose, dosagem, frequência e diferentes períodos de administração.

Um ponto importante neste trabalho é demonstrar como as ações do etanol no SNC podem resultar no aumento da atividade neuronal induzido por concentrações elevadas de adenosina (ADO) e sua consequente atuação sobre os receptores adenosinérgicos, causando alterações motoras, cognitivas e de ansiedade por mecanismos oxidativos e de alterações de LTP. Além disso, criar estratégias terapêuticas para o uso de antagonistas não-seletivos para evitar tais modificações, como o uso da cafeína. Para isto, faz-se necessário um melhor entendimento do sistema adenosinérgico.

### 1.9. SISTEMA ADENOSINÉRGICO

ADO é uma molécula ligante capaz de atuar como agonista endógeno de receptores purinérgicos, pertencente à família P1, que atuam interagindo com os receptores que compreendem 4 sub-tipos:  $A_1$ ,  $A_{2A}$ ,  $A_{2B}$  e  $A_3$ . Estes receptores são acoplados à proteína G. Os receptores  $A_1$  e  $A_3$  são reguladores inibitórios (acoplados à  $G_i/G_0$ ) e os receptores  $A_{2A}$  e  $A_{2B}$  são reguladores estimulatórios ( $G_s$ ) (CUNHA, 2001) (Figura 13).



**Figura 13:** Receptores de ADO.

Fonte: SANTIAGO et al., 2020

No SNC, os principais receptores adenosinérgicos são  $A_1$  e  $A_{2A}$ , que apresentam diferentes distribuições pelo encéfalo. Os receptores  $A_1$ , que são acoplados à proteína  $G_i$ , inibem a adenilato ciclase, ativam fosfolipase C, aumentam a condutância ao  $K^+$  através de canais retificadores, inibem pré-sinápticamente canais de  $Ca^{+2}$  do tipo N e P/Q. Normalmente quando a ADO ativa os receptores  $A_1$  exercem função inibitória na transmissão sináptica e sua ativação pré-sináptica resulta na inibição da liberação de neurotransmissores, como o GLUT e acetilcolina (ACh). A ativação pós-sináptica deste receptor resulta na redução na excitabilidade neuronal e inibem respostas mediadas pelos receptores NMDA (BOSION, 2006; FREDHOLM et al., 2005; RIBEIRO, 2005).

Na distribuição tecidual, os receptores  $A_1$  estão presentes nos neurônios do córtex, HIP, cerebelo, astrócitos, oligodendrócitos e micróglia (FREDHOLM et al., 2011; BIBER et al., 1997; OTHMAN; YAN; RIVKESS, 2003; GEBICKE-HAERTHER et al., 1996). Clinicamente, os efeitos da ADO sobre os receptores  $A_1$  estão envolvidos com neuroproteção (inibindo liberação de GLUT, NMDA e canais de  $Ca^{+2}$ ), prevenção de convulsões (mecanismos neuronais de hiperpolarização) e indutor de sono (inibindo Ach e liberando GABA na área pré-óptica ventrolateral) (BENARROCH, 2008).

Os receptores  $A_{2A}$  são acoplados à proteína  $G_s$ , que estimulam a adenilato ciclase. Podem atuar como homodímeros e heterodímeros com outros receptores que também são acoplados à proteína G e apresentam uma distribuição um pouco mais restrita no *striatum* (FREDHOLM et al., 2005; RIBEIRO; SEBASTIÃO; DE MENDONÇA, 2002; SCHARZSCHILD et al., 2006) e bulbo olfatório (SEBASTIÃO; RIBEIRO, 2009). Destaca-se também a presença destes receptores nos neurônios, micróglia, oligodendrócitos e astrócitos (HASKO et al., 2005), bem como estão presentes em espinhas dendríticas e em regiões pós-sinápticas do gânglio da base através de projeções GABAérgicas e em terminais cortico-estriatais glutamatérgicos (SCHARZSCHILD et al., 2006). De acordo com CUNHA (2001), estes receptores podem modular no córtex e HIP a liberação de Ach, serotonina ( $5-HT_1$ ), NA e GLUT.

Os efeitos da ADO sobre os receptores  $A_1$  e  $A_{2A}$  conferem neuroproteção contra excitotoxicidade promovida pelo GLUT, visto que a liberação deste neurotransmissor pode ser modulada pelos receptores de ADO, configurando estratégias terapêuticas de bloqueio destes receptores, amenizando quadros clínicos de patologias como isquemia, epilepsia, doença de Parkinson, doença de Alzheimer, depressão e fobias (GOMES et al.,



2011). Desta forma, é importante esclarecer os mecanismos no qual o etanol promove elevada concentração de ADO e consequente ativação de receptores de ADO.

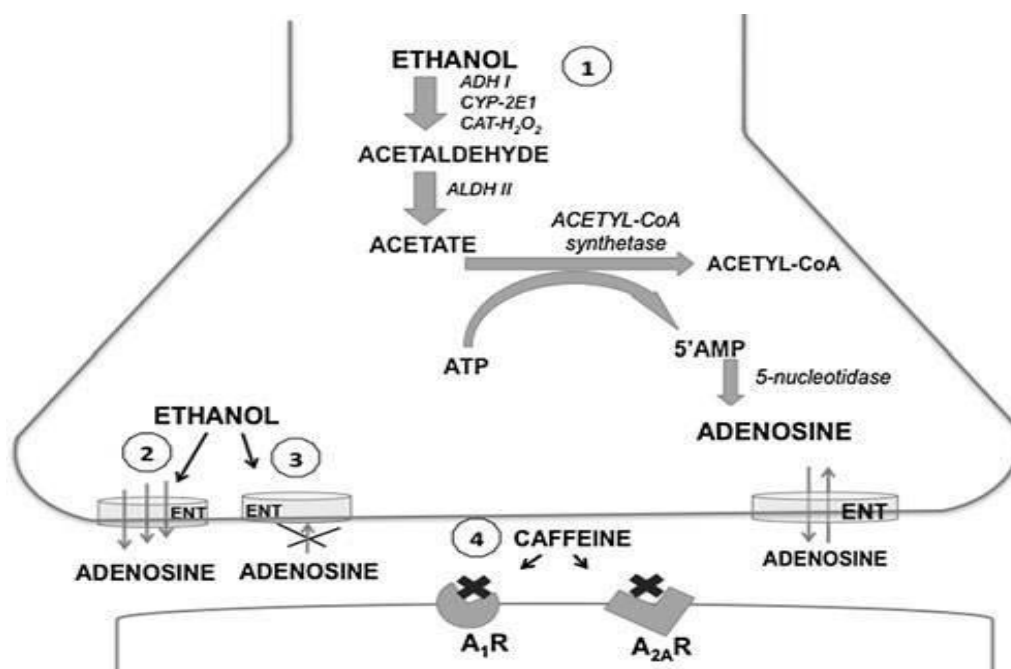
### 1.9.1 Etanol e sistema adenosinérgico

O etanol é capaz de interagir com o sistema adenosinérgico promovendo o aumento dos níveis extracelulares de ADO, através de mecanismos indiretos e diretos. Indiretamente, o metabolismo oxidativo do etanol em diferentes tecidos através dos sistemas oxidativos (ADH1, CYP2E1 e CAT) geram a formação do metabólito tóxico acetaldeído, que é convertido pela ALDH em acetato. Em seguida, a enzima acetil-CoA sintetase usa o processo energético de ATP promovendo hidrólise do mesmo para formação de Acetil-CoA. Esta hidrólise do ATP acarreta a síntese de ADO que através do transportador bi-direcional denominado de transportador nucleosídico equilibrativo tipo 1 (ENT1) aumenta a ADO extracelular (CARMICHAEL et al., 1991) (**Figura 14**).

Diretamente, o etanol é capaz de aumentar os níveis de ADO inibindo a recaptação de ADO por possível bloqueio ao transportador ENT (NAGY et al., 1990) (**Figura 14**). O principal tipo de transportador é o ENT1, que está presente tanto em ratos como nos seres humanos. Nos roedores são conhecidos como rENT1 e estão presentes em neurônios piramidais do HIP, neurônios granulares do DG, células de Purkinje e em neurônios granulares do cerebelo, bem como em neurônios estriatais e região cortical. Nos seres humanos, este transportador é chamado de hENT1 e é amplamente distribuído no encéfalo humano indicando que o sub-tipo de transportador é importante na regulação intra e extracelular nos níveis de ADO (BOSWELL-CASTEEL; HAYS, 2017).

A variação na concentração dos níveis de ADO é um fator importante, uma vez que este pode apresentar inúmeras funções, como aumentar a atividade neural em danos no encéfalo, atuar como neuromodulador e um regulador homeostático do SNC na plasticidade sináptica (CUNHA, 2001). Além disso, a ADO pode ser formada por metabolismo através de reações de hidrólise de ATP em caso de desbalanço energético, além de apresentar uma origem de moléculas que resultam dos ácidos nucleicos, como o S-adenosil-metionina (WILLIAMS, 2007).

O aumento de ADO induzido pela exposição ao etanol pode provocar hiperexcitabilidade e danos cerebrais, principalmente durante a retirada do etanol (BUTLER; PRENDERGAST, 2012). Esses mecanismos excitatórios são desencadeados pelos receptores adenosinérgicos  $A_1$  e  $A_{2A}$  expressos no sistema nervoso (DUNWIDDIE; MASINO, 2001), no qual existem substâncias como a cafeína que podem bloquear ambos os receptores (**Figura 13**).



**Figura 14** – Regulação do etanol da produção de ADO

Fonte: LÓPEZ-CRUZ; SALAMONE; CORREA, 2013

Conforme as características destes receptores adenosinérgicos, percebeu-se que a modulação destas vias pode implicar em diferentes efeitos fisiológicos e comportamentais no SNC de adolescentes em desenvolvimento, envolvendo os efeitos biológicos resultantes do consumo de etanol. Porém, faz-se necessário esclarecer as consequências da interferência do etanol neste sistema, em alterações motoras, de ansiedade e cognição que é o foco principal deste trabalho.

### 1.9.1.1. Etanol *versus* ADO na atividade motora motivacional

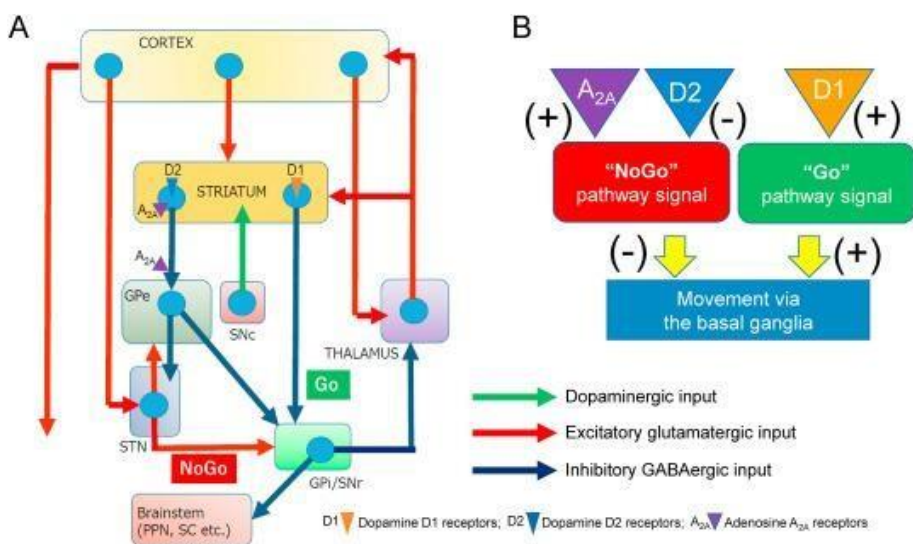
O consumo de etanol por adolescentes pode apresentar uma série de respostas comportamentais que diferem dos adultos, dentre elas podemos destacar maior sensibilidade comportamental motora, por apresentar características de imaturidade típica da idade, resultando em mudanças na impulsividade, motivação, hábitos de riscos e hábitos de consumo que são explicados pelo desenvolvimento da via mesocorticolímbica, principalmente controlados por neurotransmissores como a DA, que durante a adolescência precisam estar inibidos (CREWS et al., 2016; SPEAR, 2000). Além disso, a via mesocorticolímbica é dependente do CPF, no qual já foi observado que em camundongos adolescentes e adultos ocorre sensibilização destas vias, principalmente no NAc por mudanças extracelulares na concentração de GLUT (CARRARA-NASCIMENTO et al., 2011).

Mudanças na via dopaminérgica são resultantes da exposição ao etanol de forma repetitiva, contínua ou em abstinência desencadeando um estado hipodopaminérgico (DIANA et al., 1996), apesar de existirem estudos demonstrando estado hiperdopaminérgico (HIRTH et al., 2016) em ciclos adictos. Em estudos eletrofisiológicos é demonstrado que o etanol *per se* é capaz de aumentar disparos neuronais excitatórios mediados pela dopamina para a VTA (DIDONE et al., 2016), resultando em modificações da motivação motora. A via mesolímbica dopaminérgica, é o componente mais importante do circuito neural que regula a ativação comportamental e a capacidade de organismos em superarem tarefas que exigem comportamento motivacional e que manipulação neuroquímica ou por substâncias podem afetar tais vias (SALAMONE et al., 2012)

Classicamente, já se sabe que o sistema adenosinérgico regula atividade motora e aspectos motivacionais motores, principalmente pelos receptores  $A_{2A}$ , localizados no gânglio da base em regiões do *striatum*, em específico em neurônios de projeções espinhosa estriatopalisais através da neurocircuitária gânglio basal- tálamo-cortical. Esta circuitaria é regulada por vias diretas (denominada “Go” em inglês) e indireta (denominada “no Go” em inglês), ambas convergem para regiões internas como o *globus pallidus* (GPi) e *substância nigra pars reticulata* (SNr) formando o complexo GPi/SNr (MORI, 2020).

Normalmente, a via direta envia projeções eferentes glutamatérgicas do córtex para o *striatum*, que leva a liberação de DA e atuação deste neurotransmissor sobre os receptores D<sub>1</sub>, estimulando o complexo GPi/SNr a promover o movimento (LOZANO et al., 2010). Esta circuitaria, também pode ser controlada por fibras eferentes GABAérgicas via complexo GPi/SNr, ou seja, esta estimulação é dependente do equilíbrio glutamatérgico/GABAérgico (Figura 15A e B).

A via indireta, por outro lado é considerada supressora de movimento ou inibitória. As projeções eferentes glutamatérgicas oriundas do córtex para *striatum*, são reguladas pela formação de heterodímeros entre os receptores A<sub>2A</sub> (+ estimulatório) e D<sub>2</sub> (- inibitórios), que por conseguinte ativam projeções GABAérgicas para regiões externas do *globus pallidus* (GPe) e *núcleo subtalâmico* (STN) para o complexo GPi/SNr a suprimir o movimento (CUI et al., 2013) (Figura 15A e B). É possível que alterações de hiperexcitabilidade do etanol pelo aumento dos níveis de ADO sobre os receptores A<sub>2A</sub> sejam capazes de suprimir movimentos pela via indireta (A<sub>2A</sub>/D<sub>2</sub>) ou ainda desequilibrar o balanço glutamatérgico/GABAérgico desencadeando alterações motoras e motivacionais.



**Figura 15:** Vias diretas (Go) e indiretas (No Go) do circuito gânglio basal tálamo-cortical

Fonte: MORI, 2020

O interessante é que estas vias estriatais não são limitadas por vias exclusivamente motoras, mas do ponto de vista motivacional são importantes nos aspectos de reforço

positivo, aprendizado aversivo e respostas comportamentais em situações aversivas (BLAZQUEZ et al., 2002)

Desta forma, sugere-se que a acentuação da via adenosinérgica ou o bloqueio podem provocar alterações motoras motivacionais induzidas pelo etanol, através da manipulação farmacológica com o uso de agonistas e antagonista, seja uma estratégia de regulação (MENG; DAR, 1995; SOARES et al., 2009). Além disso, outros autores mencionam que pode ocorrer liberação de ACh de forma indireta no consumo de ATP, na conversão de acetato a acetilCoA e gerar prejuízos motores e de ansiedade (PARDO et al., 2013).

#### 1.9.1.2. Etanol *versus* ADO na ansiedade

O etanol tem sido considerado uma droga comum usada no início da adolescência, cuja curiosidade, novidade e tomada de riscos são predominantes (TOWNER; VARLINSKAYA, 2020). Essa ingestão precoce de etanol predispõe esses consumidores adolescentes à uma maior probabilidade de abuso ou dependência de etanol na vida adulta, além de contribuir para a progressão de altas doses de consumo excessivo de álcool para consumo pesado, agravando os efeitos neurotóxicos (MOREAN et al., 2018).

Estudos epidemiológicos demonstraram que a exposição ao consumo excessivo de álcool induz transtornos de humor e ansiedade, principalmente no consumo diário ou episódico (AHLSTRÖM; ÖSTERBERG, 2004; DAWSON; LI; GRANT, 2008). SPEAR (2018) relatou que as consequências toxicológicas do etanol são intensificadas entre os adolescentes como resultado de modificações na maturação cerebral e no comportamento, validadas em estudos clínicos ou experimentais.

A redução e a ruptura da integridade da substância branca, bem como a diminuição da conectividade entre o CPF e as regiões límbicas, ou seja, vias mesolímbicas e mesocorticais, mediadas pela sinalização da DA, foram encontradas na exposição ao etanol de adolescentes (NAGEL et al., 2005; SPEAR, 2018). Essas disfunções estruturais e moleculares exibem um comportamento semelhante à ansiedade de longa duração na idade adulta.

Dados da literatura têm reforçado que o comportamento do tipo ansiedade em roedores está presente em vários modelos animais envolvendo o consumo de etanol, incluindo o desenvolvimento de ansiedade social em roedores machos (VARLINSKAYA; TRUXELL; SPEAR, 2014), efeitos ansiogênicos em modelos do labirinto em cruz elevado (LCE) em animais adolescentes expostos até a idade adulta (FERNANDES et al., 2018b; NASCIMENTO et al., 2020; PANDEY et al., 2015), no modelo caixa claro-escuro (TORCASO et al., 2017), e paradigma de campo aberto (VETRENO et al., 2014).

Em estudos anteriores, nosso grupo investigou em modelo *heavy binge drinking* que o etanol desde a adolescência até a idade adulta (6,5 g/kg/dia por 55 dias) em ratos fêmeas, causou perda neuronal em áreas cerebrais, bem como aumento do estresse oxidativo acompanhado de alterações motoras, cognitivas e emocionais (OLIVEIRA et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2015). Posteriormente, investigamos as alterações comportamentais provocadas por modelos de *binge drinking* (3,0 g/kg/dia; 3 dias on - 4 dias off), para refletir um padrão usual de consumo de etanol entre adolescentes (BELÉM-FILHO et al., 2018; FERNANDES et al., 2018b; OLIVEIRA et al., 2018).

Em características semelhantes à ansiedade, descobrimos que em modelos *binge* em adolescente em ratos fêmeas ocorre comportamento semelhante à ansiedade no paradigma do LCE, que persistiu na abstinência de longa duração (14 dias; FERNANDES et al., 2018b). Nesses trabalhos, nosso grupo destaca os prováveis mecanismos envolvidos nos efeitos nocivos do etanol, como estresse oxidativo e neuroinflamação (OLIVEIRA et al., 2015). No entanto, vias fisiopatológicas adicionais foram bem documentadas, como alterações nos sistemas de neurotransmissores, principalmente regulação positiva da via glutamatérgica e regulação negativa da sinalização GABAérgica (OLSEN; LIANG, 2017).

Uma das vias, como mencionado anteriormente, que está envolvido nesse controle de neurotransmissores, é a via da ADO, no qual o etanol pode aumentar os níveis de ADO no cérebro por oxidação de acetato (Acetil-CoA à ATP) e inibição da captação celular pelo bloqueio de ENT1 (FRITZ; COMPANION; BOEHM, 2014). Assim, a hiperatividade da via adenosinérgica pode resultar em diferentes mecanismos excitatórios por alteração no equilíbrio dos receptores A<sub>1</sub> (inibitórios) e A<sub>2A</sub> (excitatórios), consequentemente afetando outros neurotransmissores envolvidos na ansiedade (FRITZ; COMPANION; BOEHM, 2014).

Dados obtidos da literatura na exploração do comportamento do tipo ansiedade LCE e o teste de campo aberto (TCA) em vários momentos após a retirada da ingestão de etanol após uma injeção intraperitoneal de uma dose aguda de etanol (4 g/kg) revelou uma alteração mais pronunciada de ansiedade entre 12-18 h (PREDIGER et al., 2006). A administração aguda de um agonista  $A_1$  (CCPA: 0,05, 0,125 e 0,25 i.p) reduziu o comportamento ansiogênico no LCE, enquanto a administração do agonista seletivo de  $A_{2A}$  (DPMA) não teve efeito sobre o comportamento ansiogênico. Por outro lado, o antagonista seletivo de  $A_1$ , 8-ciclo-pentil-1,3-dipropilxantina (DPCPX) desencadeou ansiedade (PREDIGER et al., 2006). Achados semelhantes também foram encontrados por outro grupo (KAPLAN et al., 1999).

Outros estudos também sugerem o envolvimento direto da ADO na ansiedade, uma vez que camundongos knockout para  $A_1$  promoveu aumento de ansiedade e perfil agressivo (JOHANSSON et al., 2001). Esses resultados indicam que  $A_1$  podem estar envolvidos neste comportamento e surge como um alvo farmacológico promissor para atenuar as condições de ansiedade (VAN CALKER; BIBER, 2005).

Camundongos knockout  $A_{2A}$  também exibem alterações de comportamentos semelhantes à ansiedade, assim como polimorfismos do gene ADORA2A (regulador da ansiedade) que estão associados ao comportamento social e à atividade exploratória, comportamento de ansiedade com o envolvimento do córtex cingulado anterior e amígdala (LÓPEZ-CRUZ et al., 2017). Assim, a deleção genética de  $A_{2A}$  neuronal previne ansiedade (KASTER et al., 2015), enquanto a superexpressão de  $A_{2A}$  leva a um perfil ansiogênico (COELHO et al., 2014). Estes resultados também demonstram um papel do  $A_{2A}$  no controle da ansiedade (NAM et al., 2013).

Nossa hipótese é que a exposição ao etanol induz à hiperexcitabilidade adenosinérgica no cérebro adolescente, provocando duas alterações fundamentais: (i) alterações na maturação cerebral, promovendo desequilíbrio dos receptores de ADO ( $A_1/A_{2A}$ ), induzindo comportamento do tipo ansiedade e (ii) modificação dos níveis de neurotransmissores dependentes de ADO, modificando a atividade dos neurocircuitos envolvidos na ansiedade.

O impacto da ingestão de etanol na densidade e expressão de receptores de ADO resultam em dados conflitantes. O vapor de etanol intermitente pesado crônica exposição seguida de retirada (concentração de etanol no sangue 162,1–217,9 mg/dL) para 64 h, seguidas de 8 h de retirada ou não, causa uma superexpressão de  $A_1$  no córtex cerebral,

sem alterações da densidade de  $A_{2A}$  no corpo estriado de roedores adultos (JARVIS; BECKER, 1998). Ao contrário desses achados em roedores adultos, a ingestão de etanol em camundongos adolescentes desencadeia uma redução persistente da densidade cerebral de  $A_1$  durante a retirada (BOLEWSKA et al., 2019). Uma redução da expressão e densidade de  $A_1$  no córtex cerebral e cerebelo da prole de mães expostas ao etanol foi também observado (OTHMAN et al., 2002).

Notadamente, há uma correlação positiva entre a afinidade  $A_{2A}$  e a razão de afinidade  $A_{2A}/A_1$ , mas uma correlação negativa entre a afinidade  $A_1$  e a potência (DE50) de agonistas de ADO para acentuar a incoordenação motora induzida pelo etanol (DAR, 1990). Em geral, situações nocivas desencadeiam uma regulação negativa de  $A_1$  e uma regulação positiva de  $A_{2A}$  (COELHO et al., 2014). Espera-se que essas mudanças adaptativas contribuam para um aumento na transmissão sináptica excitatória glutamatérgica (THOMPSON; HAAS; GÄHWILER, 1992), principalmente pela redução da densidade de  $A_1$ , prejudicando o controle inibitório nas sinapses, conforme relatado em estudos experimentais e clínicos (LEWIN; BLECK, 1981).

Em particular, tanto os receptores glutamatérgicos NMDA, quanto os canais de  $Ca^{+2}$  sensíveis à voltagem são controladas pela ativação tônica de  $A_1$  (DE MENDONÇA; SEBASTIÃO; RIBEIRO, 1995), bem como por  $A_{2A}$  (GONÇALVES; CUNHA; RIBEIRO, 1997), implicando que o etanol pode desequilibrar o controle da plasticidade sináptica, bem como de neurodegeneração que é criticamente dependente de receptores NMDA e de canais de  $Ca^{+2}$  (MCCOOL, 2011). Conseqüentemente, a excitotoxicidade neural, alterações na regulação homeostática por estresse oxidativo, risco de abuso e diversas alterações comportamentais, como ansiedade, podem ocorrer e provocar prejuízos cognitivos.

### 1.9.1.3- Efeitos do etanol *versus* ADO na cognição

O funcionamento cognitivo depende de múltiplos processos integrados que ocorrem em áreas do SNC. Por exemplo, a aquisição de memórias declarativas (ou espaciais) começa no HIP, por meio de alterações sinápticas, visto que danos nessa estrutura comprometem a memória recente, enquanto as memórias remotas permanecem intactas. Este fato sugere que o armazenamento cognitivo ocorre em outras estruturas,



como o neocórtex, que tem sido amplamente divulgado como um importante local de armazenamento (HERSZAGE; CENSOR, 2018). Por sua vez, o direcionamento/seleção de memórias torna-se duradouro, sendo regulado por fatores ambientais e emocionais, entre outros fatores, e essa modulação é operada por estruturas como o CPF, entre outros (LEE; NADER; SCHILLER, 2017).

Classicamente, os neurotransmissores GLUT e ACh desempenham um papel fundamental no processamento de memória (BAUDRY, 1998). No entanto, outros sistemas de sinalização regulam de forma robusta a aquisição de memória, incluindo o sistema de modulação de ADO. Desequilíbrios no sistema adenosinérgico afeta várias funções do SNC, incluindo a cognição, enquanto a superativação dos receptores adenosinérgicos, especialmente os subtipos  $A_1$  e  $A_{2A}$ , pode causar uma certa deficiência na memória (SEBASTIÃO; RIBEIRO, 2009).

Embora seja complexo definir a contribuição exata dos diferentes receptores de ADO para o controle da cognição, dado que suas respostas diferem em condições homeostáticas ou patológicas (CHEN; LEE; CHERN, 2014), um papel proeminente de  $A_{2A}$  parece evidente. A superativação farmacológica de  $A_{2A}$  (PAGNUSSAT et al., 2015) ou a superexpressão de  $A_{2A}$  em neurônios do prosencéfalo (TEMIDO-FERREIRA et al., 2018) ou a opto-estimulação do sistema de transdução  $A_{2A}$  (LI et al., 2015) é suficiente para causar uma interrupção da referência espacial no desempenho de memória.

De acordo com nossa hipótese, uma desregulação oposta no balanço de  $A_1/A_{2A}$  após a ingestão repetida de etanol pode causar déficits cognitivos. Assim, a superativação de  $A_1$  inibe a liberação de GLUT e ACh, prejudicando processos de cognição, como aquisição de memória e consolidação mediada pelo HIP (BAUDRY, 1998). Ou seja, a hiperatividade do  $A_1$  pode levar ao comprometimento cognitivo. Tal fato, foi evidenciado com o tratamento agudo com doses micromolares de agonistas do receptor  $A_1$  que induziram déficits na aquisição e retenção de memória, enquanto a administração de antagonistas seletivos do receptor  $A_1$  reverteram esses efeitos negativos (PAUL et al., 2011). Portanto, substâncias que promovem um aumento ou desequilíbrio na atividade deste receptor de ADO pode produzir deficiências mnemônicas, especialmente em períodos críticos de desenvolvimento/remodelação do SNC (AHMED; BITTENCOURT-HEWITT; SEBASTIAN, 2015).

Dados epidemiológicos revelam que o consumo de etanol, especialmente em um padrão *binge*, geralmente começa durante a adolescência (CHUNG et al., 2018), e os

circuitos neurais no cérebro imaturo são vulneráveis a vários fatores que modulam a função cerebral (JONES; LUERAS; NAGEL, 2018). Assim, quatro ciclos cumulativos do paradigma de consumo excessivo de álcool (3 g/kg/dia) durante a adolescência prejudicam a memória de curto prazo em tarefas de reconhecimento de objeto de maneira após a retirada imediata de etanol (FERNANDES et al., 2018b). de fato, diversos estudos sobre o consumo de álcool durante a adolescência têm relatado déficits mnemônicos ao aplicar diversos testes cognitivos (BRIONES; WOODS, 2013; STEINBERG, 2005), destacando os efeitos potencialmente perigosos de consumo em diferentes tipos de memória.

Partindo do pressuposto que o etanol aumenta a atividade do sistema adenosinérgico, estes mecanismos toxicológicos podem desencadear estresse oxidativo, hiperatividade glutamatérgica e modificações de LTP, como possíveis causas de distúrbios mnemônicos na adolescência durante o consumo de etanol (WEST; MAYNARD; LEASURE, 2018). Ou seja, é possível que o aumento de atividade de ADO promova dessensibilização heterogênea de maneira imediata em A<sub>1</sub> e A<sub>2</sub>. Estudos de microdiálise detectaram um aumento 4x maior nas concentrações de ADO no parênquima cerebral logo após o consumo de etanol, que estava associado aos distúrbios cognitivos (PAUL et al., 2011). Além disso, estudos em *zebrafish* explorando as consequências a longo prazo do etanol expostos em distintas fases embrionárias, indicou o surgimento de um comprometimento mnemônico, que foi revertida pela administração aguda de um inibidor da ecto-5'-nucleotidase (uma enzima que converte AMP extracelular em ADO) (HAAB LUTTE et al., 2018).

No entanto, existem algumas peculiaridades relacionadas aos processos de amadurecimento durante a adolescência, que podem gerar resultados diferentes. Por exemplo, tanto a expressão aumentada de receptores de ADO e a regulação negativa de sua recaptação (via ENT1) parecem estar associados ao consumo contínuo, acompanhado por múltiplos episódios de abstinência (NAGY et al., 1990). Este fato é relevante, uma vez que o *binge* drinking, frequentemente praticado por adolescentes, caracteriza-se por um consumo intermitente, que proporciona condições favoráveis para a ocorrência de desses mecanismos (CHUNG et al., 2018).

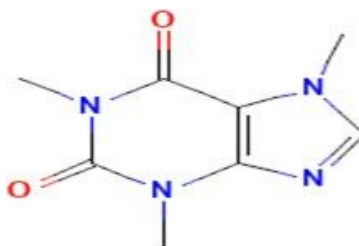
Infelizmente, poucas abordagens avaliaram a relação deste padrão de ingestão de álcool com adaptações do sistema ADO afetando o processamento da memória, principalmente na adolescência, que aguardam novas investigações para desvendar novas

estratégias terapêuticas. Uma de nossas propostas neste trabalho é manipular farmacologicamente estes receptores e compreender por qual via o processo mnemônico é mais afetado, a partir do uso de bloqueadores não-seletivos como a cafeína e seletivos de  $A_{2A}$  como o SCH58261.

### 1.9.2. Cafeína e antagonista seletivo de $A_{2A}$ (SCH58261)

A Cafeína foi descoberta no chá de *Camellia sinensis* e no café obtido da espécie *Coffea arabica* no ano de 1820 (KIHLMAN, 1977). Sendo um dos fármacos psicoativos ou nutracêuticos mais populares e consumidos ao redor do mundo, está presente na dieta do cotidiano, principalmente pelo consumo de cafés, chás, chá-mate, barras de chocolate e bebidas cafeinadas (FISONE; BORGKVIST; USIELLO, 2004). A média de consumo estimada globalmente é de aproximadamente 70-76 mg/dia/pessoa, em países pertencentes à Europa e à América do Norte. Este consumo é considerado alto em contraponto com países produtores da planta de café que apresentam um baixo consumo de Cafeína, como no Brasil que consome cerca de 40mg/dia/pessoa (BARONE & ROBERTS, 1996; FREDHOLM et al., 1999).

O alto consumo global ocorre principalmente devido aos seus efeitos psicoestimulantes, que são oriundas de suas propriedades químicas e farmacológicas. Quimicamente a cafeína é denominada 7-diidro-1, 3,7-trimetil-1H-purina 2,6-diona ou como 1,3,7-trimetilxantina (alcalóide purinérgico - Farmacologicamente), que possui propriedades hidrofóbicas capaz de atravessar facilmente as membranas biológicas como a barreira hematoencefálica, como identificado em neonatos através do líquido cérebro espinhal (BURDAN, 2015) (**Figura 16**).



**Figura 16:** Estrutura química da cafeína

**Fonte:** NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, 2022

Farmacocineticamente, tanto em humanos como nos animais, este composto é absorvido rapidamente e de forma completa através do trato gastrointestinal (99%). Além disso, nas mesmas espécies quando comparado à via oral e intravenosa, os picos de concentração plasmática são semelhantes (ARNAUD, 1993). Em concentrações abaixo de 10mg/kg, a cafeína apresenta tempo de meia-vida na faixa de 0,7 a 1,2h em ratos e camundongos. Em humanos, esta meia-vida prolonga-se na faixa de 2,5h à 4,5h, não ocorrendo diferenças neste parâmetro entre jovens e idosos (ARNAUD, 2010).

Adicionalmente, a cafeína quando ingerida por via oral sofre metabolismo de primeira passagem no fígado, originando metabólitos como dimetilxantinas, monometilxantinas, derivados de ácido úrico e ácido uracila, bem como dimetilalantoína e trimetilalantoína (ARNAUD, 1993). Dentre estes, destaca-se a 1,3-dimetilxantina (Teofilina) e 1,7-dimetilxantina (paraxantina), pois são farmacologicamente ativos onde suas influências de efeitos biológicos devem ser descartadas (FREDHOLM et al., 1999). Condicionalmente, os roedores possuem um metabolismo em cerca de 40% maior que o ser humano para a metabolização de cafeína e formam principalmente a paraxantina, via Citocromo P450 e sua isoforma CYP1A2 (FUHR et al., 1996).

A cafeína apresenta múltiplos mecanismos farmacológicos dependendo de suas diferentes concentrações plasmáticas, tais como antagonista não-seletivo dos receptores de ADO, inibição de fosfodiesterases, ativação de receptores de rianodina (um canal liberador de  $Ca^{+2}$  intracelular) e antagonismo de receptores GABA<sub>A</sub> (YAMATO et al., 2002). Estes efeitos podem variar conforme a dose utilizada. Neste trabalho, a dose utilizada foi de 10 mg/kg, no qual as principais investigações foram restritas ao envolvimento do sistema adenosinérgico (FREDHOLM et al., 1999). Basicamente, grande parte dos efeitos psicofarmacológicos da cafeína no SNC ocorre por antagonismo não-seletivo de receptores adenosinérgicos, tanto receptores A<sub>1</sub> quanto A<sub>2A</sub>, como preferencial atuação sobre A<sub>2A</sub> em situações nocivas (SVENNINGSSON; JOHANSSON; FREDHOLM, 1996).

O SCH58261 é considerado um potente antagonista e altamente seletivo para receptores A<sub>2A</sub>. Este composto não é derivado das xantinas, sendo obtido através de síntese química e destaca-se pela presença de grupos fenil com piperazinas que conferem o bloqueio dos receptores A<sub>2A</sub> (SHAH et al., 2008). Além disso, apresenta baixa solubilidade aquosa, concentrações plasmáticas e biodisponibilidade oral indetectáveis, e

quando administrado pela via intraperitoneal suas concentrações plasmáticas atingem a  $C_{max}$  de 109ng/mL e biodisponibilidade de 75,7%.

Estes dados farmacocinéticos indicam que o SCH58261 apresenta baixa permeabilidade pela parede do trato gastrointestinal ou está sujeito ao metabolismo do intestino e/ou fígado. Este apresenta tempo de meia-vida de aproximadamente 26,7 min por via intravenosa permite penetrar no sistema nervoso em 5min, porém em baixas concentrações. Após 1h, estas concentrações são mínimas, indicando pobre penetração sistêmica. Considerando a relação de expressão dos receptores  $A_{2A}$  em humanos e ratos, ficou demonstrado que o SCH58261 é um potente antagonista seletivo destes receptores (YANG et al., 2007). Estudos já demonstraram que o bloqueio seletivo destes receptores pode apresentar potenciais efeitos neuroprotetores como na doença de Parkinson (MORELLI; WARDAS, 2001), isquemia (MONOPOLI et al., 1998) e morte neuronal hipocampal (STONE; BEHAN, 2000).

### **1.9.3. Cafeína e o bloqueio seletivo dos receptores $A_{2A}$ como ferramenta terapêutica em desordens motivacionais motoras, ansiedade e cognitiva.**

#### 1.9.3.1. Atividade motora motivacional

A hipótese de que os mecanismos toxicológicos de exposição ao etanol resultam de hiperexcitabilidade da função  $A_1$  e  $A_{2A}$  implica na conclusão de que um antagonismo de  $A_1$  e  $A_{2A}$ , como o proporcionado pela cafeína pode ser particularmente eficaz para controlar os distúrbios comportamentais causados pela exposição ao etanol (FREDHOLM et al., 1999). Como mencionado anteriormente, o receptor  $A_{2A}$  consiste em um alvo farmacológico interessante, frente às alterações motoras motivacionais induzidas pelo consumo *binge drinking* de etanol, no qual é possível que ocorra uma superativação ou superexpressão ocasionado pelo estresse do consumo excessivo alcoólico, semelhante às situações patológicas, como no Parkinson. Ou seja, ao promover o bloqueio não-seletivo ou seletivo da via da ADO confere uma estratégia robusta frente às alterações motoras motivacionais dependentes do circuito tálamo-cortical e

mesocorticolímbico, uma vez que o bloqueio promovido pela cafeína ou SCH58261 aumenta a transmissão dopaminérgica em receptores D<sub>2</sub> (FERRE; VON; FUXE, 1992).

Estudos têm demonstrado que a cafeína reduz a atividade de neurônios dopaminérgicos em neurônios do circuito mesocorticolímbico como VTA (STONER et al., 1988), mas não na substância negra em baixas concentrações, o que nos sugere o uso de baixas doses neste trabalho, evitando possível mecanismo de recompensa. Além disso, em estudos de atividade locomotora espontânea (dependente do CPF), a cafeína promoveu em ratos e camundongos comportamento bifásico, no qual o limiar de efeito é entre 1 à 3 mg/kg e o pico de efeito ocorre entre 10 à 40 mg/kg, com posterior supressão motora em doses elevadas (FREDHOLM et al., 1999). Outro ponto importante, é que o próprio etanol apresenta comportamento bifásico na atividade locomotora espontânea em baixas doses com estimulação e em altas doses com supressão motora (BOERNGEN-LACERDA; SOUZA-FORMIGONI, 2000).

A maioria dos estudos têm demonstrado o uso combinado dessas substâncias (WALDECK, 1974). Os efeitos do etanol (1, 3 ou 4g/kg, i.p) e cafeína (25, 50 e 100 mg/kg, pela mesma via), observou que a dose de 25 mg/kg de cafeína potencializou a atividade locomotora espontânea do etanol em baixas doses (1 g/kg) e foi suprimida em altas doses de etanol (3 g/kg). Em contrapartida, a maior dose de cafeína (100 mg/kg) promoveu supressão da atividade motora espontânea frente às baixas doses de etanol (1 g/kg). A maior dose de etanol (4 g/kg) que foi supressora motora foi potencializada por todas as doses de cafeína. Outro estudo demonstrou que a co-administração aguda de baixas doses de cafeína (10 mg/kg) com etanol (1,6, 2,4 e 3.2 g/kg) aumenta a atividade locomotora espontânea (KURIBARA; ASAHI; TADOKORO, 1992).

Em outras palavras, o uso de baixas doses de parece ser uma estratégia viável para os bloqueadores adenosinérgicos, porém as respostas comportamentais parecem variar dependendo do modelo, dose, concentrações e regime de administração. Neste trabalho, nossa proposta é investigar estes efeitos após a retirada do etanol, uma vez como já mencionado, estabelecemos em nosso modelo *binge* drinking de etanol (3 days on /4 days off) alterações motoras considerando os aspectos motivacionais.

### 1.9.3.2. Ansiedade

Neste trabalho, a mesma hipótese de hiperexcitabilidade é mantida para os aspectos emocionais da ansiedade, na seguinte forma: (i) se o bloqueio não-seletivo ou seletivo de  $A_1/A_{2A}$  deve ser considerado um alvo potencial para reverter o perfil de ansiedade induzido pelo etanol; (ii) se a inibição parcial de receptores de ADO induz ou normaliza o equilíbrio e o tônus durante a maturação cerebral de adolescentes; (iii) que dose e regime de tempo de ingestão de cafeína seria necessário para os benefícios?

A cafeína surge como uma ferramenta nutracêutica útil, uma vez que este composto bioativo é um antagonista não seletivo do receptor de ADO, que geralmente apresenta um perfil ansiogênico. A ingestão aguda de cafeína em doses elevadas de 1000mg/kg v.o desencadeia efeitos ansiogênicos em humanos ligados a distúrbios psiquiátricos, tais como ataques de pânico. A tolerância surge com a administração continuada e a ansiedade também surge na retirada (FREDHOLM et al., 1999).

Estudos experimentais demonstram que a cafeína (25 e 50 mg/kg, i.p) exibem efeitos ansiogênicos no paradigma do LCE, que não tem efeito com a dose de 10 mg/kg. Isto sugere que a cafeína apresenta efeitos dependendo de variáveis distintas, como regime de dose (BHATTACHARYA; SATYAN; CHAKRABARTI, 1997; BRUCE, 1990; NUTT, 1990).

De acordo com FREDHOLM (1982), doses não tóxicas de cafeína bloqueiam seletivamente diferentes subtipos de receptores de ADO. Essas baixas doses de cafeína são equivalentes à ingestão de 1-3 xícaras de café, o que restringe as ações nos receptores de ADO, conferindo um tratamento benéfico ou uma estratégia de proteção. Assim, entende-se que a modulação do repertório ansiogênico gerado pela cafeína depende da dose, do padrão de administração, sexo, idade e período de exposição (KULKARNI; SINGH; BISHNOI, 2007).

No entanto, a relação entre a dose de cafeína *versus* o fenótipo de ansiedade ainda é contraditória (BHATTACHARYA; SATYAN; CHAKRABARTI, 1997; GARCIA; CARDENAS; MORATO, 2011; HUGHES et al., 2014). Em primeiro lugar, a cafeína aguda em doses altas (25-50 mg/kg) pode provocar efeitos ansiogênicos e ansiolíticos opostos em tarefas comportamentais (BHATTACHARYA; SATYAN; CHAKRABARTI, 1997; GARCIA; CARDENAS; MORATO, 2011; HUGHES et al.,

2014). Tais diferenças têm sido atribuídas a diferentes níveis ansiogênicos intrinsecamente relacionados às diferentes linhagens de animais (HUGHES et al., 2014). Além disso, a exposição repetida à cafeína, bem como a estímulos nocivos, leva à uma alteração adaptativa da expressão e densidade de receptores de ADO no cérebro, que abrem o caminho para considerar que a administração crônica de baixas doses de cafeína ou o bloqueio seletivo dos  $A_{2A}$ , pode ser uma importante ferramenta para reverter ou atenuar a ansiogênese em condições patológicas, tais como àquelas derivadas da exposição ao etanol.

Este trabalho estabeleceu e validou um novo protocolo de tratamento crônico com cafeína (10 mg/kg por 21 dias), seguindo esta lógica de pensamento em fêmeas adolescentes submetidas ao *binge* drinking etanol. Em primeiro lugar, investigamos a homeostase do osso alveolar, na qual a cafeína impediu que o etanol induzisse perda óssea sem participação dos  $A_{2A}$  (MAIA et al., 2020 – ANEXO A). Neste trabalho, foi adotado o mesmo protocolo para modelos de ansiedade e função motora, avaliando novas estratégias de manipulação farmacológica como ferramentas terapêuticas, ou seja, pelo bloqueio não-seletivo e seletivo dos receptores de ADO.

Um importante estudo conduzido por PREDIGER et al. (2006) demonstraram que o agonismo  $A_1$  em modelo de etanol do tipo ressaca estabelece efeitos ansiolíticos, inferindo que uso de agonistas podem bloquear a redução da expressão de  $A_1$  induzido por etanol, bem como inibir a liberação de GLUT durante a ansiedade mediada por etanol. No entanto, os receptores  $A_{2A}$  não devem ser negligenciados, pois existem indícios de estratégia potencial de neuroproteção, visto que o bloqueio de  $A_{2A}$  pode reequilibrar a liberação anormal de GLUT e catecolaminas envolvidos na ansiedade.

### 1.9.3.3. Cognição

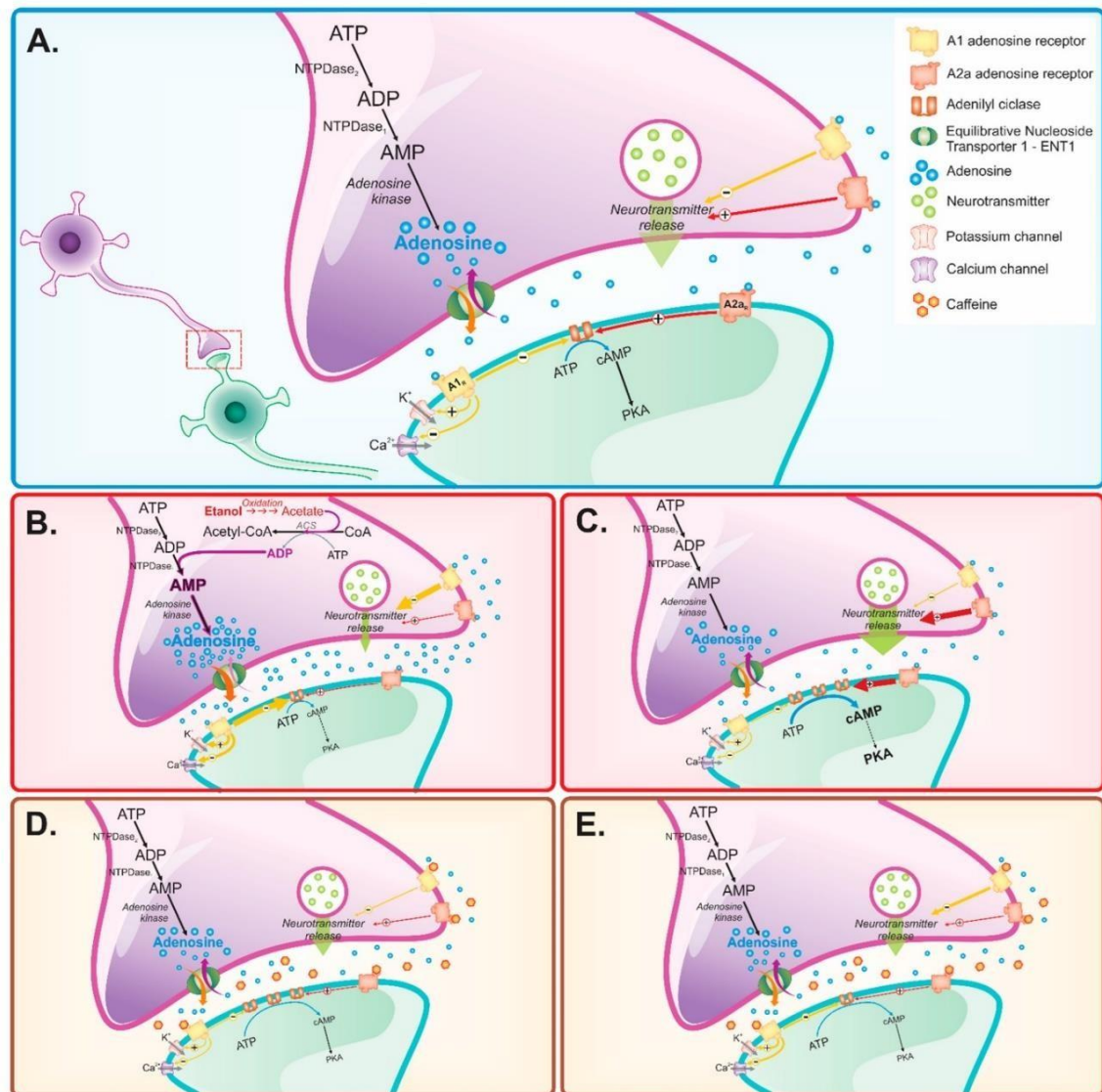
Há evidências de que o consumo regular de cafeína moderada atenua os déficits de memória (TAKAHASHI, 2008). Isso fica mais evidente quando se consideram os efeitos benéficos da ingestão de cafeína em diferentes modelos de doença de Alzheimer, como em modelos transgênicos que levam à superfunção da cascata amilóide (ARENDASH et al., 2006; STAZI et al., 2021) ou tau (LAURENT et al., 2014a), bem como em modelos de doença de Alzheimer esporádica (ESPINOSA et al., 2013). Essa



prevenção de déficits de memória pela cafeína é mimetizada pelo bloqueio farmacológico ou genético de  $A_{2A}$  (TEMIDO-FERREIRA et al., 2018; VIANA DA SILVA et al., 2016). Além disso, a cafeína também previne o comprometimento da memória em diferentes modelos animais de distúrbios neuropsiquiátricos através do antagonismo de  $A_{2A}$  (ALHAIDER et al., 2010; LAURENT et al., 2014b; PANDOLFO et al., 2013). Esta informação ressalta para um esperado benefício associado à ingestão de cafeína para atenuar o comprometimento da memória induzido pelo etanol.

A interação entre o tratamento com etanol e cafeína foi estudada sob o contexto terapêutico. Assim, estudos em humanos demonstraram que o consumo crônico de bebidas cafeinadas melhora o tempo de reação (desempenho de atenção, memória de recordação por sonda e medição cognitiva) em voluntários saudáveis administrados cronicamente com baixas doses frente ao etanol (0,5–0,75 g/kg) (DRAKE et al., 2002; FRANKS et al., 1975). Tais achados clínicos estão de acordo com estudos experimentais que relatam que uma dose aguda de cafeína (50 mg/L) melhora os déficits de memória induzidos por doenças crônicas expostos ao etanol em modelos de zebrafish. Por outro lado, doses altas de cafeína (100 mg/L) não melhoraram os déficits cognitivos induzidos pelo etanol (SANTOS et al., 2016).

Além disso, a administração de baixas doses de cafeína (5 mg/kg) previne danos de memória retrógrada induzidos por uma única dose de etanol (3,0 g/kg) (SPINETTA et al., 2008). Todos esses resultados indicam que a cafeína pode ser uma ferramenta terapêutica para prevenir ou mitigar distúrbios mnemônicos induzidos pelo álcool, embora ainda não foi definido qual receptor de ADO está envolvido nesta ação mediada pela cafeína. Assim, há muitas possibilidades para testar nossa hipótese conforme estudo previamente publicado por nosso grupo de pesquisa em PINHEIRO et al. (2022) (**Figura 17, ANEXO B**). Portanto, neste trabalho utilizamos a cafeína e o SCH58261 para evitar as alterações comportamentais e estresse oxidativo, bem como investigar o papel dos receptores  $A_{2A}$  na formação de LTP, após *binge* drinking etanol de ratos fêmeas da adolescência a fase adulta.



**Figura 17:** A ação da ADO nos receptores A<sub>1</sub> e A<sub>2A</sub> promove importante regulação da neurotransmissão no cérebro (A); o consumo excessivo de etanol tem o potencial de aumentar os níveis de ADO, modulando ENT1, gerando níveis aumentados e hiperatividade de ADO na fenda sináptica, atuando especialmente nos receptores A<sub>1</sub> (B); como consequência, ocorre a neuroadaptação, reduzindo o tônus de receptores A<sub>1</sub>, favorecendo a hiperatividade dos receptores A<sub>2A</sub> (C). A Caf, ao bloquear os receptores de ADO, promove a modulação da hiperatividade mediada pelo receptor A<sub>2A</sub>, reduzindo os efeitos do consumo de etanol (D) e, a longo prazo, poderia reverter a neuroadaptação (E). Assim, em teoria, a Caf poderia ser usada como agente terapêutico para combater os efeitos deletérios do etanol.

**Fonte:** PINHEIRO et al., 2022



---

---

## **II. OBJETIVOS**

---

---

## 2. OBJETIVOS

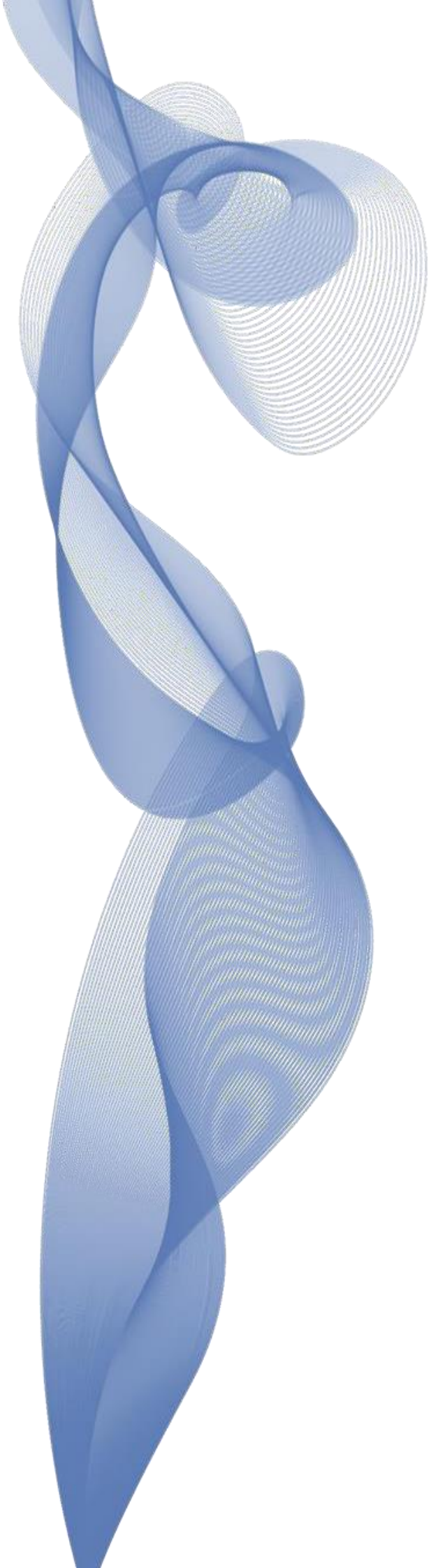
### 2.1. OBJETIVOS GERAIS

Investigar os efeitos da cafeína e do SCH58261 sobre as alterações comportamentais e de estresse oxidativo, bem como verificar o papel do receptor  $A_{2A}$  nos distúrbios de LTP em ratos fêmeas, intoxicados por etanol em padrão *binge* da adolescência à fase adulta.

#### 2.1.1. Objetivos específicos

Avaliar os efeitos da cafeína e do envolvimento dos receptores de adenosina  $A_{2A}$  em ratos fêmeas intoxicadas por etanol sobre

- as alterações locomotoras motivacionais;
- as alterações de emocionalidade (ansiogênica);
- as alterações de cognição;
- as alterações no balanço oxidativo;
- verificar o envolvimento dos receptores de adenosina  $A_{2A}$  sobre as alterações na formação de LTP.



---

### **III.MATERIAIS E MÉTODOS**

---

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. ANIMAIS

Os procedimentos experimentais para o manuseio dos animais foram aprovados pelo comitê de ética em pesquisa com animais e experimentação da Universidade Federal do Pará (UFPA), sob o número de 8324250716 (presente em **ANEXO C**) e o comitê de cuidado de animais do Centro de Neurociências e Biologia Celular de Coimbra, sob número ORBEA\_238\_2019/14102019), obedecendo-se aos critérios e as normas estabelecidas pelo guia de cuidado e uso de animais de laboratoriais (2011). Neste estudo foram utilizados um total de 102 animais fêmeas adolescentes (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar (70g-250g), obtidos do Biotério Central do Instituto Evandro Chagas (IEC/PA), com idade de 30 dias, correspondentes ao período da adolescência (35° dia de vida) (SPEAR; SWARTZWELDER, 2014).

Estes animais foram encaminhados e mantidos em sala de acomodação para animais da Faculdade de Farmácia, UFPA e devidamente alojados em gaiolas abertas (sistema *open cage*) de polipropileno, contendo 4 animais por gaiola, mantidos sob condições controladas de temperatura (25°C) e ciclo de claro/escuro de 12h; a fase clara iniciando-se às 6h e terminando às 18h, com comida e água *ad libitum*. Os ensaios comportamentais foram realizados no laboratório de farmacologia da inflamação e comportamento (LAFICO), da Faculdade de Farmácia, UFPA, quando realizados no Brasil e os mesmos procedimentos foram adotados na UC, Portugal.

Após o término de cada teste, os roedores foram sacrificados por técnica de ruptura física da atividade cerebral, através do descolamento cervical, que consiste em aplicar uma pressão na base do crânio, separando-se o crânio da medula espinhal. O descarte das carcaças destes animais foi realizado através de sacos plásticos brancos com o símbolo indicativo de material infeccioso (Risco Biológico) e encaminhado para empresa terceirizada responsável pelo descarte de resíduos biológicos na UFPA e UC.

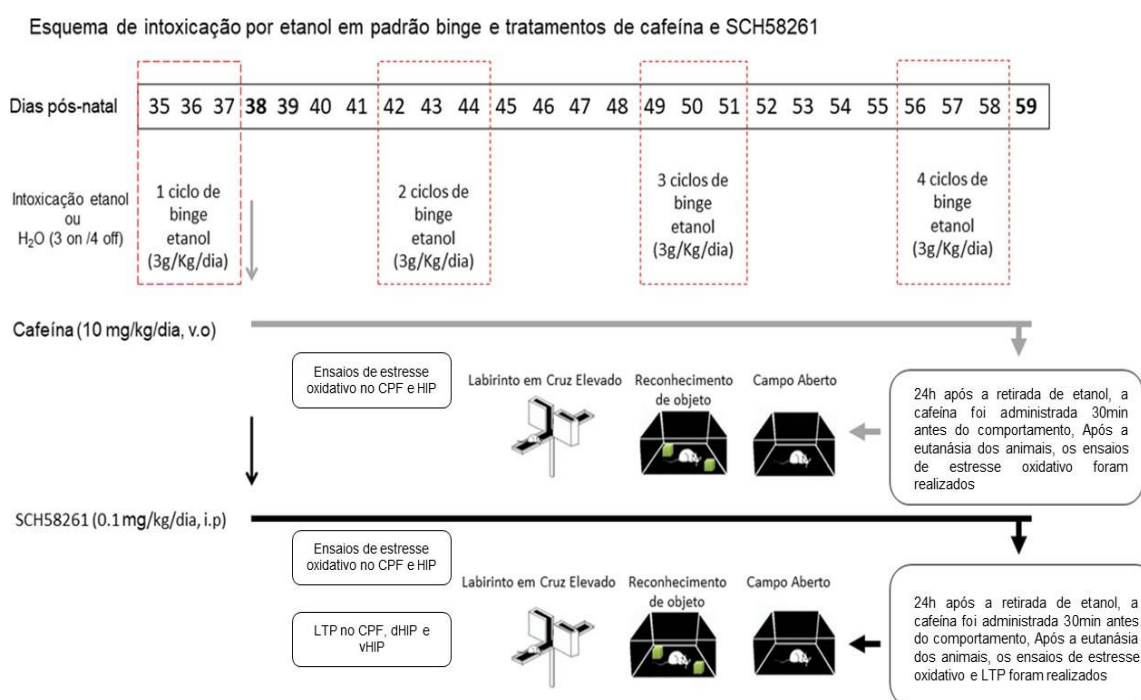
#### 3.2. DELINEAMENTO DO ESTUDO E GRUPOS EXPERIMENTAIS

O esquema experimental iniciou-se quando os animais estavam com 35 dias pós-natal e estes foram submetidos a quatro ciclos de exposição ao etanol em padrão *binge*



*drinking*, que consiste em ingestão de 3 dias consecutivos de etanol (3 dias *on*) e 4 dias de abstinência (4 dias *off*), com 20% p/v de etanol ou água destilada através de gavagem (v.o) (BERTOLA et al., 2013; FERNANDES et al., 2018b).

Os animais expostos ao padrão *binge drinking* ou água destilada, receberam doses uma vez ao dia, durante o período da manhã por volta de 08:00. Inicialmente os animais foram divididos em 2 grupos, que receberam álcool ou água destilada. Vinte e quatro horas após o 1º ciclo de padrão *binge*, os animais foram subdivididos em 4 sub-grupos: dois sub-grupos continuaram a receber etanol e os outros dois sub-grupos água destilada por 23 dias (até o 58º dia pós-natal). Para investigação dos efeitos da cafeína, dois sub-grupos que receberam etanol ou água destilada, passaram a receber diariamente baixas doses de cafeína (10 mg/kg/dia, v.o- Sigma-Aldrich, USA), por 22 dias (59º dia pós-natal) ou antagonista do receptor A<sub>2A</sub> SCH58261 (Ant; 0,1 mg/kg/dia, i.p; Sigma-Aldrich, USA) por 22 dias (até 59º dia pós-natal). Tanto a cafeína quanto o Ant nos 22 dias de experimento foram administrados 30 min antes dos testes comportamentais, conforme trabalho publicado por nosso grupo em MAIA et al. (2020) (Figura 18, Quadro 1).



**Figura 18:** Linha do tempo e esquema de tratamento experimental

**Legenda:** Esquema de tratamento e intoxicação ocorreu de 35º ao 59º dia pós-natal, as caixas tracejadas indicam o momento de intoxicação de etanol (3 on-4 off), totalizando 4 ciclos e encerramento no 58º dia. A seta cinza presente no 38º dia em destaque, indica o início do tratamento com Caf e persistiu até o 59º dia (linha contínua cinza), enquanto a seta preta presente no 38º dia em destaque, indica o início do tratamento com o SCH58261 e persistiu até o 59º dia (linha contínua preta), com uma última administração

30 min antes dos ensaios comportamentais realizados campo aberto, reconhecimento de objeto e labirinto em cruz elevado. Posteriormente, para os grupos tratados com Caf e SCH58261 realizou-se os ensaios bioquímicos de estresse oxidativo, e para a investigação eletrofisiológica do envolvimento dos receptores A<sub>2A</sub> pelo SCH58261 foram selecionados as seguintes áreas mPFC, parte dorsal e ventral do HIP.

O desenho experimental resultou em 6 grupos: controle (água destilada), Etanol, Etanol + Caf, Caf, Etanol + Ant e Ant (Ver **quadro** descritivo dos grupos). A dosagem de cafeína é equivalente estequiometricamente à 250 mg/kg em humanos (2-3 xícaras de bebida), que apresenta ação farmacológica nos receptores adenosinérgicos A<sub>1</sub> e A<sub>2A</sub> restritos ao SNC (FREDHOLM et al., 1999). A dose de SCH58261 foi definida como supramáxima, com antagonismo seletivo do receptor A<sub>2A</sub>, além de promover resposta protetora em diversos modelos animais (CUNHA, 2016; MAIA et al., 2020; YANG et al., 2007). Após os testes comportamentais, os animais foram anestesiados com uma mistura de cetamina 10% (10mg/mL) e xilazina 2% (2 mg/mL). O CPF e HIP foram coletados para ensaios bioquímicos. Na verificação de LTP foi utilizado os grupos Controle, Etanol, Etanol + Ant e Ant nas regiões mPFC, dHIP e vHIP.

**Quadro 1:** Descrição de grupos experimentais

Grupos	Descrição	N1	N2
Controle	Os animais foram tratados com H <sub>2</sub> O destilada (1mg/mL, v.o) em regime de 3on/4off por 4 ciclos repetidos	10-15	6-7
Etanol	Os animais foram intoxicados por etanol (3g/kg/dia, v.o) em regime de 3on/4off por 4 ciclos repetidos	7-11	6-8
Etanol + Caf	Os animais foram intoxicados por etanol (3g/kg/dia, v.o) em regime de 3on/4off por 4 ciclos repetidos e receberam Caf (10mg/kg/dia, v.o) após o 1º ciclo até um dia após ao 4º ciclo de <i>binge</i>	9-13	Não realizado
Caf	Os animais receberam Caf (10mg/kg/dia, v.o) após o 1º ciclo até um dia após o 4º ciclo de <i>binge</i>	8-12	Não realizado
Etanol + Ant	Os animais foram intoxicados por etanol (3g/kg/dia, v.o) em regime de 3on/4off por 4 ciclos repetidos e receberam SCH58261 (0,1mg/kg/dia, via i.p) após o 1º ciclo até um dia após o 4º ciclo de <i>binge</i>	7-10	4-8
Ant	Os animais receberam SCH58261 (0,1 mg/kg/dia, via i.p) após o 1º ciclo até um dia após o 4º ciclo de <i>binge</i>	7-10	4-8
<b>Total de animais</b>	<b>NT = N1 (comportamento) + N2 (eletrofisiologia); 102 animais</b>	71	31



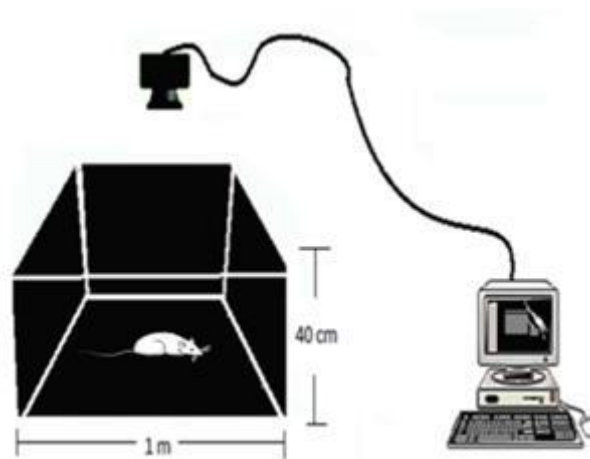
### 3.3. ENSAIOS COMPORTAMENTAIS

Vinte e quatro horas após a última administração de etanol e 30 min após o tratamento com cafeína ou Ant, o teste do campo aberto, reconhecimento de objeto e LCE foram aplicados, das 08h00 às 17h00. Todos os ensaios foram registrados por vídeo-monitor acoplado ao computador e analisados pelo *software* Any-maze® (Stoelting Co., Wood Dale, IL, EUA). Todos os testes comportamentais ocorreram em sala controlada, com atenuação acústica e de iluminação (12 lux). Previamente aos testes comportamentais, os animais foram conduzidos e mantidos na sala experimental por 1h para habituação. Após cada sessão do animal, todos os aparatos foram limpos com solução de etanol a 10%, sempre conduzido pelo mesmo experimentador.

#### 3.3.1 Teste do Campo Aberto

O teste do campo aberto é uma importante ferramenta para análise da locomoção em roedores, no qual o comportamento de ratos e camundongos pode ser afetado por dois padrões comportamentais, a atividade locomotora espontânea e a emocionalidade. Os parâmetros de emocionalidade foram avaliados a partir da exploração da área central da arena, que corresponde ao estudo do comportamento do tipo-ansiedade, sendo considerado um estímulo aversivo (KARL; PABST; VON HÖRSTEN, 2003)

Para este teste, foi utilizada uma arena em acrílico preta (100x100x40cm), dividida virtualmente em 25 quadrantes iguais (20x20cm), separados em duas zonas para avaliação motora e de emocionalidade: uma central (9 quadrantes centrais) e periférica (16 quadrantes periféricos). Inicialmente os animais foram colocados, individualmente, no quadrante central do campo aberto e permitindo o livre deslocamento dentro do aparato por 5 minutos conforme **figura 19**.



**Figura 19:** Teste do Campo Aberto

**Fonte:** Autor, 2022

Este ensaio seguiu metodologia descrita por KASTER et al. (2015) e BELÉM-FILHO et al. (2018), avaliando a atividade locomotora horizontal dos animais, através da distância total percorrida (metros); e o comportamento emocional dos animais, através da distância central percorrida (metros) e o tempo de permanência (s) no centro da arena, que foram medidos automaticamente pelo ANYmazeTM.

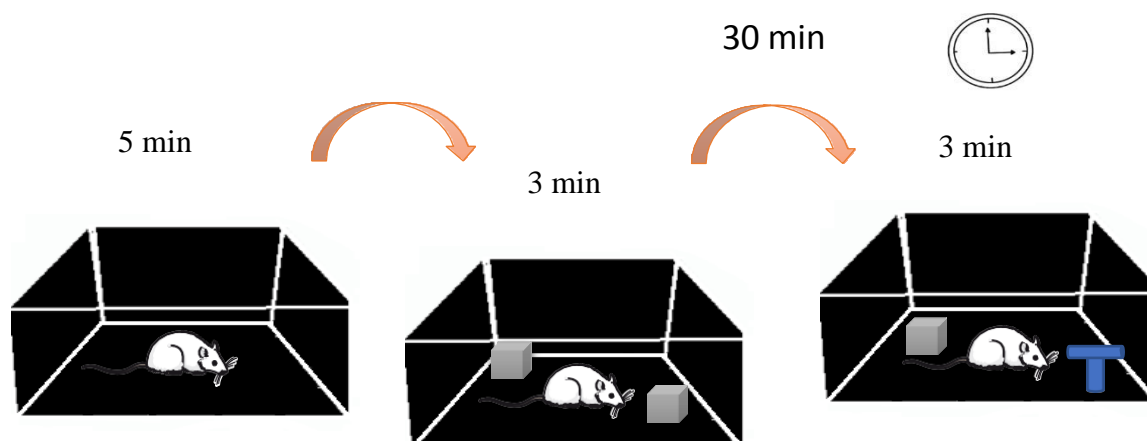
### 3.3.2. Teste de Reconhecimento de Objeto

O teste de reconhecimento de objeto baseia-se no princípio de que, em um ambiente familiar, os roedores demonstram um comportamento exploratório para novos estímulos, 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 et al. (2009), no qual consiste em 3 fases: i) uma fase de habituação; ii) uma fase de treino; iii) e uma fase de teste. A fase de habituação foi considerada quando o animal explorou livremente o aparato no teste do campo aberto, sem objetos, por 5 min. As fases de treino e de teste duraram 3 min cada com intervalos de 30 min, a fim de avaliar a memória de curta duração. Após 30 min da fase de habituação, os animais foram submetidos à fase de treino, no qual 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 70 cm afastados um do outro. Foi mensurado o tempo de investigação no objeto familiar (TF). Na fase de teste, uma cópia

idêntica do objeto familiar (C3) e um objeto novo (X) foi disposto na arena, nos mesmos locais anteriormente ocupados pelos objetos C1 e C2 da fase de treino. O tempo de investigação no novo objeto foi mensurado (TN).

O novo objeto selecionado (X), com diferença estrutural dos cubos, em forma de pirâmide ou “T” (T) foi utilizado para a fase de teste conforme a **figura 20**. Todos os objetos foram construídos com blocos de plástico Lego (São Paulo, SP, Brasil).



**Figura 20:** Testes de Reconhecimento de Objeto

**Fonte:** Autor, 2022

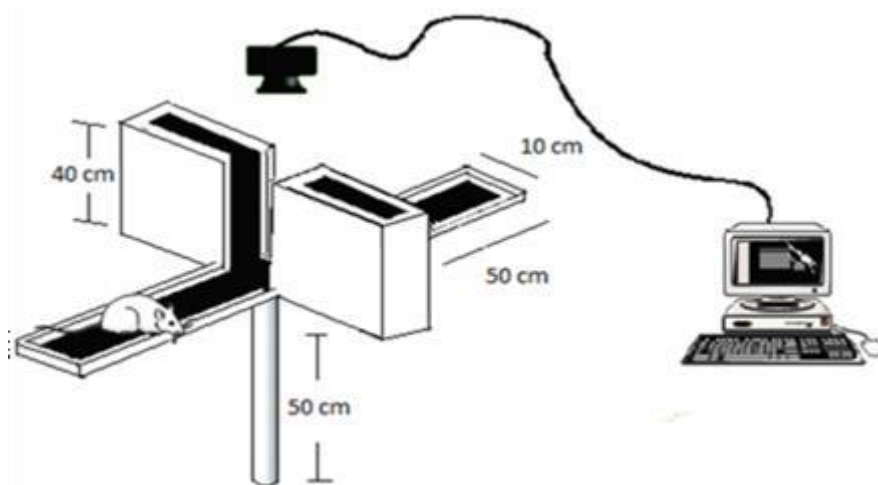
A razão de discriminação de objeto foi definida como  $(TN-TF) / (TN + TF)$ . Os valores do índice de discriminação variam de -1 a +1. Valores em torno de +1 são indicativos de exploração de objetos novos, enquanto valores em torno de -1 são indicativos de exploração de objetos familiares (FERNANDES et al., 2018b).

### 3.3.3. Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

O LCE é um aparato elevado do chão, constituído de duas passarelas em forma de uma cruz simétrica, tendo dois braços opostos fechados por paredes laterais, e dois braços opostos abertos elevados do chão a uma altura de 50 cm (**Figura 21**). Neste teste, o animal foi colocado no centro do LCE com a face voltada para um dos braços fechados, sendo permitida a exploração do labirinto por 5 min. O comportamento do tipo ansiedade foi medido pelo tempo gasto nos braços abertos, bem como o percentual de entradas nos braços abertos (PELLOW; FILE, 1986). Estes parâmetros estão inversamente

relacionados com a ansiedade. O número de entradas no braço fechado reflete a atividade motora geral (PELLOW; FILE, 1986). Além disso, o movimento de mergulhar a cabeça sobre as bordas dos braços abertos, a avaliação de risco, o *grooming* e os bolos fecais também podem ser registrados (KARL; PABST; VON HÖRSTEN, 2003). O número de entradas nos braços abertos (EBA) e fechados (EBF) e o tempo de permanência dos animais nos braços abertos (TBA) do equipamento foram medidos automaticamente pelo ANY-maze®.

As porcentagens de EBA (%EBA) foram calculadas em relação ao número total de entradas nos dois braços e, as de TBA (%TBA), ao tempo de exploração nesses braços em relação ao tempo total do experimento. As %EBA e %TBA foram respectivamente calculadas de acordo com as fórmulas:  $(EBA / EBA + EBF) \times 100$ ;  $(TBA / TBA + TBF) \times 100$  (BAHI, 2013).



**Figura 21:** Teste de Labirinto em Cruz Elevado

**Fonte:** Autor, 2022

### 3.4 ENSAIOS DE ESTRESSE OXIDATIVO

Os ensaios de estresse oxidativo foram realizados no Laboratório de Ensaios in vitro, Imunologia e Microbiologia, da Faculdade de Farmácia, Instituto de Ciências da Saúde e no Laboratório de Neuroquímica Celular e Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, ambos da Universidade Federal do Pará.

A coleta de material biológico ocorreu logo após os testes do comportamento, tendo sido coletado CPF e HIP (n = 3-6 animais/grupo), ambos destinados avaliação de parâmetros oxidativos. A coleta de material biológico foi precedida com o procedimento

anestésico xilazina 2% (2 mg/mL) e cetamina 10% (10 mg/mL). Em seguida realizou-se craniotomia para a retirada do encéfalo e posterior dissecação do CPF e HIP. Em seguida, as amostras foram pesadas e acondicionadas em tubos do tipo *eppendorf* com tampão fosfato salino (PBS: PH = 7,4) na proporção 1:10.

Posteriormente foi realizado a disrupção com disruptor ultrassônico (Ultra-Turrax, IKA-Werke GmbH & Co) para obtenção de homogenato. Após este processo, as amostras foram centrifugadas (5000 rpm por 10 minutos) em 4°C e o sobrenadante coletado e armazenado a -80°C para posterior ensaios bioquímicos de estresse oxidativo. Todos os resultados de estresse oxidativo foram corrigidos por mg de proteínas e convertidos em porcentagem em relação ao grupo controle (% Controle).

### **3.4.1. Atividades antioxidantes não-enzimáticas**

#### **3.4.1.1. Capacidade antioxidante total**

Para determinação deste parâmetro foi realizado o teste do TEAC (Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox), que consiste na inibição do cátion  $ABTS^{\bullet+}$  (radical 2,2'-azinobis-[3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico]) por antioxidantes endógenos e exógenos presentes na amostra (VASCONCELOS et al., 2007).

Os antioxidantes presentes na amostra promovem a redução na absorção proporcional à sua concentração. As capacidades antioxidantes das amostras foram expressas como  $\mu\text{mol}$  de TEAC/100g, utilizando uma curva de calibração traçada com diferentes quantidades de Trolox e a sua absorbância medida a 740 nm. A metodologia utilizada foi adaptada de RUFINO et al. (2007). Inicialmente foram preparadas as soluções estoques: solução estoque  $ABTS^{\bullet+}$  7mM (192 mg de ABTS em 50 mL de água destilada), solução de persulfato de potássio 140 mM (378,4 mg de persulfato de potássio em 10 mL de água destilada).

O radical  $ABTS^{\bullet+}$  foi preparado a partir da reação de 5mL da solução estoque de  $ABTS^{\bullet+}$  com 88  $\mu\text{L}$  da solução de persulfato de potássio. A mistura foi mantida no escuro, à temperatura ambiente, por 16 horas. Após este período foi preparada a solução de trabalho, diluindo-se 1 mL da solução de radical  $ABTS^{\bullet+}$  em álcool etílico até obter uma absorbância de  $0,70 \pm 0,05$  a 734 nm. O procedimento consistiu em ler a absorbância em 740nm, adicionar 20 $\mu\text{L}$  da amostra, ler a absorbância em 740nm após exatamente 3

min. As cubetas foram mantidas à 37°C e as leituras realizadas em espectrofotômetro com fluxo contínuo.

#### 3.4.1.2. Níveis de tiol (glutathiona total)

A GSH é um tripeptídeo, formado por L- $\gamma$ -glutamil-L-cisteinilglicina, que exerce várias funções na célula. Entre elas, destaca-se o papel como cofator 61 da família de enzimas glutathiona peroxidase (GPx), em que desempenha papel protetor contra o estresse oxidativo, com sua oxidação a glutathiona dissulfeto. A GSH é o único tiol não proteico presente em espécies aeróbias e atua como importante antioxidante, que inclui ação como desintoxicante de xenobióticos e de espécies reativas ao oxigênio (ERO) (VASCONCELOS et al., 2007).

A determinação dos níveis intracelulares de GSH foi realizada de acordo com a metodologia de ELLMAN (1959), com modificações (SCHALCHER et al., 2014). Este método é baseado na capacidade que a GSH presente na amostra possui de reduzir o composto ácido-5,5-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB) para ácido nitro benzoico (TNB), sendo esta reação acompanhada por leitura no espectrofotômetro à 412 nm. Foi retirada 20  $\mu$ L das amostras de CPF e HIP, e adicionado à 180  $\mu$ L de água destilada. Após isto, foram retirados 20  $\mu$ L e adicionados mais 20  $\mu$ L de água destilada e 4 mL de PBS e agitados em vórtex.

Para o procedimento de leitura foram retirados 3 mL das amostras e colocadas na cubeta de leitura do espectrofotômetro, sendo lido a absorbância referente ao tempo 0 (T0). Seguidamente, foram adicionados 100  $\mu$ L do DTNB e foi iniciada a contagem do tempo de 3 min. As amostras foram lidas no tempo de 1 min a partir da adição da reagente (T1) e no tempo de 3 min (T3) e os resultados foram detectados em  $\mu$ g/mL/mg proteína e convertidos.

### 3.4.2. Atividades antioxidantes enzimáticas

#### 3.4.2.1 Atividade enzimática da catalase (CAT)

A CAT é uma enzima antioxidante ubíqua que está presente na maioria das células aeróbicas e está envolvida na desintoxicação de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), uma ERO considerada produto tóxico do metabolismo normal e pode estar presentes em condições patológicas celulares (GLORIEUX; CALDERON, 2017).

O procedimento consiste em adicionar 20  $\mu$ L de reagente padrão Cayman® e 20  $\mu$ L das amostras nos poços. Posteriormente, colocar 30  $\mu$ L de metanol e 100  $\mu$ L de tampão de ensaio (100 mM de Fosfato de Potássio, pH 7.5): 1 mL de Tampão 10X em 9 mL de água destilada. Logo, em seguida adicionar rapidamente, 20  $\mu$ L de peróxido de hidrogênio (35,28mM), misturar a reação e agitar em temperatura ambiente por 20 min.

Após a primeira reação, adicionar 30  $\mu$ L de hidróxido de potássio (10M) e Purpald em cada poço, misturar e agitar em temperatura ambiente por 10 min para segunda reação. E por último, adicionar 10  $\mu$ L de periodato de potássio em todos os poços, misturar, encubar por 5 min a temperatura ambiente e realizar a leitura de absorvância.

O método é baseado na reação da CAT com o metanol na presença de  $H_2O_2$ . O produto de formação desta reação gera formaldeído que é medido colorimetricamente com 4-amino-3-hidrazino-5-mercapto-1,2,4-triazol (Purpald). Este cromógeno formado adquire coloração púrpura e os resultados foram expressos como  $\mu$ M formaldeído/min/mg de proteína e convertidos em % do controle. A leitura das absorvâncias na microplaca foram feitas em 540nm (BIO-RAD model 450) conforme protocolo de RODRIGUES et al. (2019).

#### 3.4.2.2. Atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD)

SODs são metaloenzimas catalisadoras da dismutação do ânion superóxido para oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio e, portanto, formam uma parte crucial do mecanismo de defesa antioxidante celular (FRIDOVICH, 2013).

Primeiramente, deve-se preparar o tampão da amostra (tampão fosfato / EDTA, pH 7,8), diluir 200 mg de  $KH_2PO_4$  em 30 ml de água (50 mM) corrigindo o pH à 7,8. Adiciona-se 6  $\mu$ l de 0,5 M EDTA (0,1mM) para 30 ml de solução. Por conseguinte,

prepara-se o Tetrazólio Nitro Azul (NBT), 0,125 mM (MW 817,6): 2 mg de NBT (Diluir primeiramente em 8ul de DMSO) para 20 ml de tampão de ensaio. Adicionalmente, dilui-se 2.875 µl de SOD (1000 U/mL) em 100 µl de tampão de amostra.

Após, o preparo das soluções, adicionou-se 200 µL do radical detector diluído (solução de NBT) e 10 µL de padrão (tubos A - I) ou 10 µl de amostra por poço. Em seguida coloca-se 20 µl de xantina oxidase diluída (Diluir 4,3 µl de xantina oxidase, Sigma, 5U/0,34ml, em 1 ml de tampão de amostra. Posteriormente, agita-se a placa e incuba-se por 20 min para a leitura das absorbâncias.

A metodologia utilizada é baseada em MEEROVICH et al. (2014), consiste no uso de sais de tetrazólio, como o tetrazólio de nitroazul, para detecção de radicais superóxidos gerados por xantina oxidase e hipoxantina. A oxidação do tetrazólio ocorre por reação com o oxigênio reativo intracelular que forma cristais de formazano e podem ser quantificados por espectrofotometria usando um filtro de 620 nm (BIO-RAD modelo 450 Microplate Reader). Os resultados foram expressos como intensidade de absorbância / mg de proteína e convertido.

### **3.4.3. Sistema Oxidante**

#### **3.4.3.1. Determinação de Nitritos e Nitratos (marcador para NO)**

O ensaio de Griess é um dos métodos mais populares e mais simples utilizados para detectar a concentração de óxido nítrico (NO). O mecanismo de Griess é resumido como o acoplamento azo entre as espécies de diazônio, que são produzidos a partir de sulfanilamida por NO<sub>2</sub>, e N-naftil-etilenodiamina. Portanto, o total de metabólitos de NO são detectáveis. A análise quanto à produção de nitritos e nitratos pela reação de Griess ocorrerá de acordo com GREEN et al. (1982). As amostras foram desproteinizadas com auxílio de sulfato de zinco (ZnSO<sub>4</sub>) 15 g/L, em seguida centrifugadas a 3000 rpm durante 15 min, sendo pipetado o sobrenadante. Foram adicionados 100µL destas alíquotas em cubeta para leitor de ELISA incubadas com 100µL dos reagentes (50µL da solução de sulfanilamida 1% e 50µL de solução de N-naftil-etilenodiamina 0,1% em 2,5% de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) à temperatura ambiente por 10 min. A leitura foi realizada em leitor de ELISA com absorbância de 570 nm.



### 3.4.3.2. Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)

A dosagem de MDA foi realizada de acordo com a metodologia de PERCÁRIO (1994), baseado na formação do complexo com ácido tiobarbitúrico com MDA, TBA-MDA. A etapa inicial consistiu em preparar aproximadamente 1000 ml de água destilada acidificada até pH 2,5, utilizando para isso um pHmetro. Em seguida, foi pesado 10 g de fosfato monobásico de potássio e misturado em água destilada acidificada dentro de um béquer de 500 ml até completa dissolução. O conteúdo foi então transferido para um balão volumétrico de fundo chato de 1000 ml, acrescentando água acidificada até completar 1000 ml da solução. Dessa forma foram preparados 1000 ml de fosfato monobásico de potássio – tampão fosfato 75 mM (pH 2,5).

O ácido tiobarbitúrico (TBA) (SIGMA®) 10 Nm utilizado para formação do complexo TBA-MDA. Foi de 0,144g de TBA para 100 ml da solução de fosfato monobásico de potássio, terminando a dissolução completa. A solução padrão de MDA (1,1,3,3-tetrahidroxipropano, SIGMA®) 20  $\mu$ M foi preparada, inicialmente, a partir de uma solução de 400  $\mu$ M/L, através de pipetagem de 99  $\mu$ L do produto original em 1L de água destilada usando um balão volumétrico de 1L. O procedimento seguiu diluindo esta solução na proporção de 5 ml de solução padrão de MDA 400  $\mu$ M em 100 ml de água destilada, chegando a concentração de 20  $\mu$ M. Com as soluções prontas, uma estante era montada com tubos de ensaio identificados, com paredes reforçadas e resistentes a alta temperatura. Iniciou-se com a pipetagem de 1 ml do reagente TBA 10 nM em cada tubo de ensaio.

Para o tubo de controle branco e padrão foram adicionados 500  $\mu$ l de água destilada 500  $\mu$ l de solução padrão de MDA 20  $\mu$ M. Por fim, os tubos em diante receberam 500  $\mu$ l das amostras de CPF e HIP. Em seguida, os tubos fechados foram colocados em banho-maria à 94 °C durante 1 hora, a vedação foi para evitar perda ou contaminação das amostras com água condensada. Após 1h de banho-maria, as amostras foram resfriadas em temperatura ambiente durante 15 min.

Observou-se nesta fase a coloração de tonalidade rósea proporcional à quantidade de MDA nas amostras. A cada tubo de ensaio foi acrescentado 4 mL do reagente álcool

n-butílico, tampados com rolhas apropriadas e submetidos à homogeneização no vórtex para alcançar máxima extração do MDA para a fase orgânica. Por fim, os tubos foram centrifugados a 2500 rpm por 10 minutos, sendo 3 ml do sobrenadante, pipetados para a cubeta e lido em espectrofotômetro calibrado em 535 nm e zerado com o tubo controle branco.

As amostras foram novamente submetidas a alguns minutos em banho-maria a 37 °C antes da leitura, caso fosse observado condensação das amostras nos tubos de ensaio. O cálculo para o valor de MDA da amostra foi obtido pelo emprego da seguinte fórmula com os resultados expressos em ng/ml:  $MDA = \text{Absorbância das amostras} \times (10 \times 440,61 / \text{Absorbância padrão MDA/mg de proteína})$ . Para esta análise utilizou-se como parâmetro de medida as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), como indicativo de peroxidação lipídica.

### 3.5 DOSAGEM DE PROTEÍNAS

Para a quantificação de proteínas utilizou-se o kit doless®, baseado na reação de Biureto modificado conforme BRADFORD (1976), o teste consiste em reagir o biureto com uma solução de sulfato de cobre, citrato trissódico, carbonato de sódio e hidróxido de sódio com as proteínas da amostra de CPF e HIP, formando um complexo corado de cor violeta, que é proporcional à concentração proteica da amostra.

O procedimento consiste em diluir a solução concentrada de biureto (100 mL, Citrato trissódico à 0,114M; Carbonato de sódio 0,21M e Sulfato de cobre 0,01M), a um balão volumétrico de 500 mL e completar com água destilada. Adicionar 2,5 mL em 3 tubos (branco, teste e padrão). Por conseguinte, adicionar 50 µL de amostra ao tubo teste e colocar 50 µL de solução padrão no tubo padrão. Finalmente, adicionar 2 gotas de Hidróxido de sódio, homogeneizar e deixar em repouso durante 5min e realizar a leitura em espectrofotômetro em 550nm. Os resultados foram expressos em proteínas totais (g/dL), sendo posteriormente utilizados para correção dos resultados obtidos.

### 3.6. REGISTROS ELETROFISIOLÓGICOS

Os registros extracelulares *ex-vivo* foram realizadas com modificações para o mPFC pré-límbico (KERKHOF et al., 2018) e para o dHIP e vHIP (REIS et al., 2019) nos seguintes grupos: controle, etanol, etanol + Ant e Ant. Estes ensaios foram realizados no Centro de Neurociências e Biologia Celular de Coimbra, Portugal.

### 3.6.1. Secções cerebrais

Vinte e quatro horas após a retirada do último ciclo de *binge*, os ratos foram decapitados sob anestesia com halotano e seus cérebros rapidamente removidos e submersos em solução gelada de líquido cefalorraquidiano artificial (aCSF), contendo (em mM); 124 NaCl, 4,5 KCl, 2 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, 26 NaHCO<sub>3</sub>, 1,2 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e 10 D-glicose, solução está submetida a uma mistura gasosa de 95% de O<sub>2</sub> - 5% de CO<sub>2</sub>. Secções coronais (300 µm de espessura) contendo o mPFC pré-límbico, foram cortadas com um sistema de seccionamento Vibrátomo 1500 (Vibratome 1500, Leica, Wetzlar, Alemanha) sendo obtidos aproximadamente 20 fatias para a melhor escolha de detecção de corrente. Em seguida, os HIP foram dissecadas e obtidas secções transversais dorsais e ventrais (400 µm de espessura), em seguida foram levadas a um cortador de tecidos McIlwain (RRID: SCR\_015798) para realização de 12 cortes perpendiculares ao longo do eixo do HIP, sendo os três primeiros dorsais e 9°, 10° e 11° os ventrais. As secções foram então transferidas para uma pré-câmara contendo aCSF sob oxigenação contínua para recuperação a 32°C por pelo menos 1h. Após este tempo, as fatias individuais foram transferidas para uma câmara de gravação submersa e continuamente superfundidas a uma taxa de 2-3 mL/min com aCSF gaseado mantido a 30°C.

### 3.6.2. mPFC pré-límbico.

Um eletrodo de estimulação concêntrica bipolar SNE-100 (Kopf, Alemanha) foi colocado na camada II/III do mPFC pré-límbico fornecendo pulsos retangulares de 0,1 ms de duração aplicados com um estimulador de corrente Digitimer DS3 (Digitimer, Ltd., Reino Unido) uma vez a cada 15 s. Os picos populacionais evocados nos neurônios foram registrados através de um microeletrodo de borossilicato extracelular (preenchido com aCSF, resistência de 3-6 MΩ-megaohm) colocado na camada V do mPFC pré-límbico, usando um amplificador Axopatch 200B (Axon Instruments, Inc., Estados Unidos),

acoplado a uma placa de aquisição analógica/digital (Digidata 1550A; Axon Instruments, Inc., Estados Unidos). As respostas foram digitalizadas a 10 kHz e monitoradas continuamente em um computador via software PClamp (Axon Instruments, Inc., Estados Unidos).

As respostas foram quantificadas como a amplitude dos registros de pico da população neuronal inicialmente de forma contínua (que mostra uma resposta integrada entre os neurônios piramidais e interneurônios de pico rápido). Após estabilizar a resposta, a curva de entrada/saída (input/output) foi obtida aumentando continuamente a intensidade do estímulo, iniciando com uma intensidade que não provocou nenhuma resposta e terminando quando a resposta máxima do pico populacional é atingida. Em seguida, a intensidade do estímulo foi regulada para obter a amplitude de pico da população de linha de base (40-50% da resposta máxima) entre 0,3 e 0,4 mV antes da indução de LTP. A LTP foi induzida por um conjunto de estimulação de alta frequência (HFS) a 100 Hz (50 pulsos, 0,5 s de duração) em intervalos de 10 min inicialmente, seguido por mais quatro estímulos de 100 Hz (50 pulsos, 0,5 s de duração, 1 a cada 10 segundos).

A magnitude de LTP foi calculada comparando a média das amplitudes do pico populacional evocado de neurônios em 20-30 min (10 min) após o conjunto de HFS (4 x 100Hz estímulos) com a média da amplitude do pico populacional de neurônios 10 min antes do HFS (1x 100Hz, linha de base).

### **3.6.3. dHIP e vHIP**

Sob o controle visual de uma lupa (World Precision Instruments, Hertfordshire, Reino Unido), um eletrodo de estimulação concêntrica bipolar SNE-100 (Kopf, Alemanha) foi colocado sobre a via colateral-comissural de Schaffer, fornecendo pulsos de teste retangulares de 0,1 ms de duração por meio de um circuito elétrico S44. estimulador (Grass Instruments, West Warwick, RI, EUA) a cada 20 s a 0,05Hz. Os potenciais pós-sinápticos excitatórios de campo ortodrômicos evocados (fEPSP) foram registrados com um microeletrodo de borossilicato (preenchido com solução de NaCl 4 M, resistência de 2-4 M $\Omega$ ) colocado no *stratum radiatum* da área CA1. O sinal foi amplificado (amplificador ISO-80, World Precision Instruments, Hertfordshire, Reino

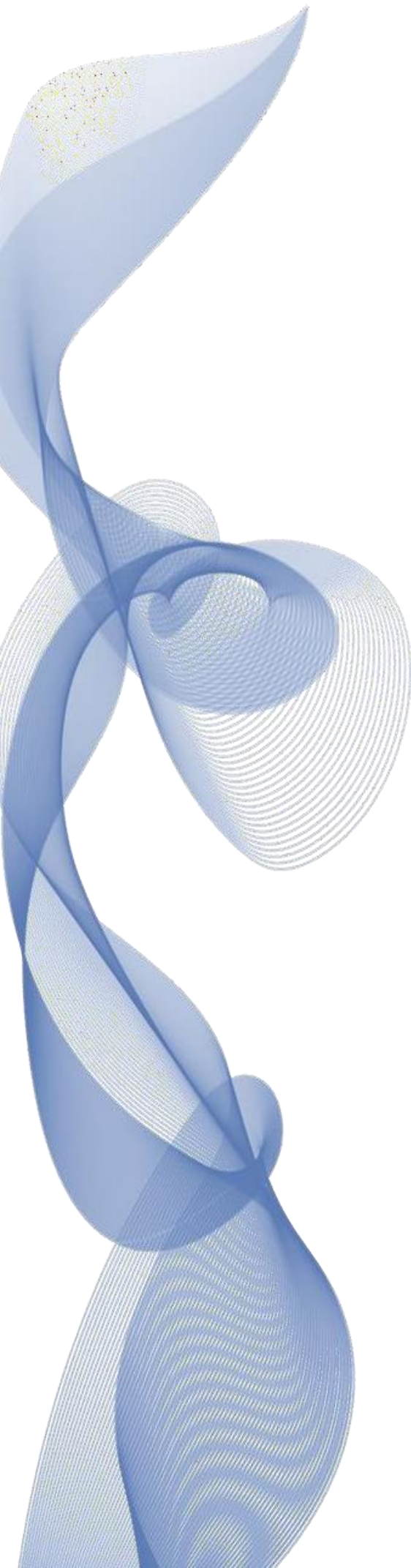
Unido) e digitalizado usando uma placa conversora analógico-digital ADC-42 (Pico Technologies, Pelham, NY, EUA).

A resposta pós-sináptica foi quantificada como a inclinação máxima da fase ascendente do fEPSP e três respostas consecutivas foram continuamente calculadas e monitoradas em um computador usando o software WinLTP 1.01 (ANDERSON; COLLINGRIDGE, 2001). Após estabilizar a resposta, a curva de entrada/saída (input/output) foi obtida aumentando continuamente a intensidade do estímulo, iniciando com uma intensidade que não provocou nenhuma resposta e terminando quando a resposta máxima do pico da população de neurônios evocada é atingida. Em seguida, a intensidade do estímulo foi regulada para obter 40-50% da resposta máxima antes da indução da LTP (linha de base).

A LTP foi induzida pela aplicação de uma estimulação de alta frequência (HFS) consistindo em um único conjunto de pulsos a 100 Hz por 1 s. A magnitude da LTP foi calculada comparando a média das amplitudes pico populacional neuronal 35-45 min (10 min) após HFS (conjunto de estímulos 4 x100Hz) com a média da amplitude dos primeiros 10 min antes HFS (linha de base – 1x 100Hz).

### 3.7. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas foram realizadas pelo software Sigma Plot® 14.0. Todos os resultados foram expressos como média  $\pm$  S.E.M (7-15 animais por grupo para testes comportamentais; 3-5 amostras por grupo para ensaios bioquímicos e de 4-8 para os registros eletrofisiológicos). O teste de normalidade foi realizado pelo teste de Shapiro-Wilk. A comparação estatística foi aplicada com ANOVA one-way seguida do teste de Holm-Sidak para múltiplas comparações post hoc, adotando-se um nível de significância de 95%. Comparações estatísticas únicas entre dois grupos experimentais independentes seguindo uma distribuição normal foram analisadas usando um teste t de Student não pareado. O nível de significância estabelecido foi  $p < 0,05$ .



---

---

#### IV. RESULTADOS

---

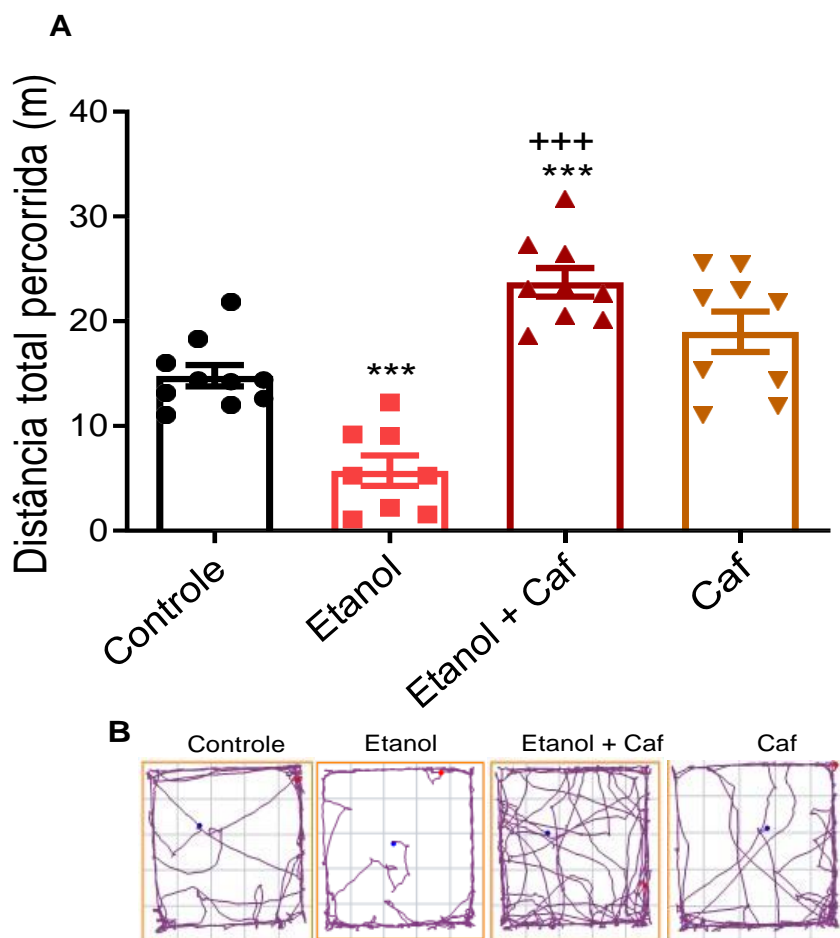
---

## 4. RESULTADOS

### 4.1. TESTES COMPORTAMENTAIS MOTORES MOTIVACIONAIS

#### 4.1.1. A cafeína de longo-prazo melhora a atividade locomotora espontânea após *binge drinking* etanol durante a adolescência

Após a intoxicação por 4 ciclos de etanol em padrão *binge* (3g/kg/dia, v.o) demonstrou-se que no parâmetro de distância total percorrida (m) (**Figura 22 - painel A**) que o grupo etanol foi capaz de reduzir de maneira significativa este parâmetro comparando-se ao grupo controle (Controle [ $14,8 \pm 1,01$ ] vs Etanol [ $5,72 \pm 1,44$ ], \*\*\*  $p < 0,001$ ), indicando alterações motoras induzidas pelo etanol.



**Figura 22-** Efeitos da (A) cafeína (10 mg/kg/dia) após *binge drinking* etanol (3,0 g/kg/dia; 3 dias on - 4 dias off) no TCA da adolescência à idade adulta de ratos fêmeas no parâmetro distância total percorrida.

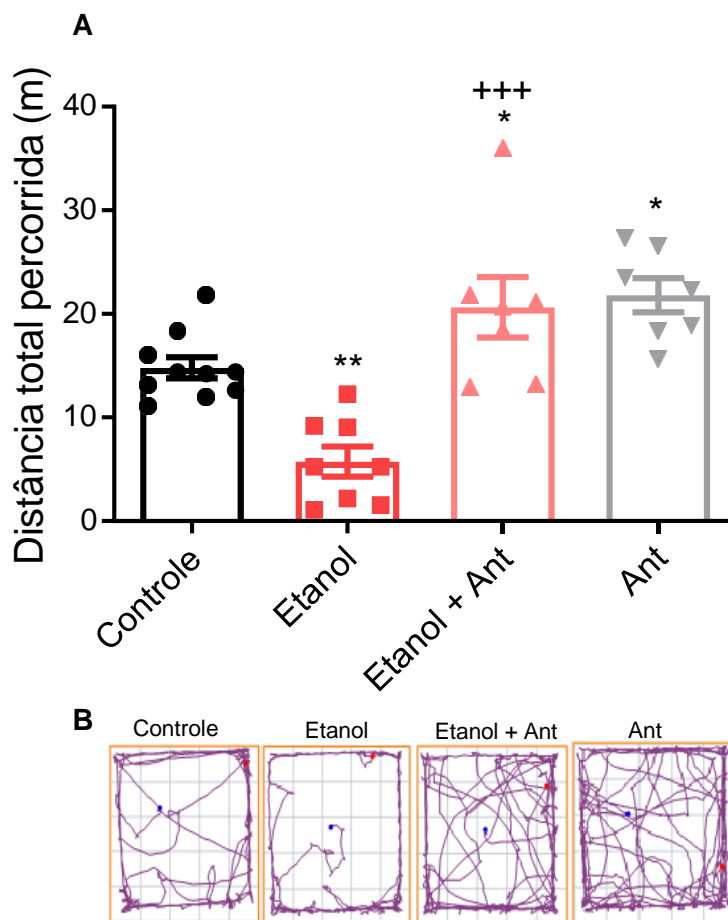
(B) Parcelas ocupacionais da trilha dos animais na arena de CA. Os valores foram obtidos como média  $\pm$  e.p.m de  $n = 8-10$  animais por grupo (A). Os dados foram significativos comparando: (A) Controle vs Etanol (\*\*\*)  $p < 0,001$ , Etanol + Caf vs Controle (\*\*\*)  $p < 0,001$  e Etanol + Caf vs Etanol (+++)  $p < 0,001$ ). Todos os testes foram submetidos à ANOVA one-way seguida do teste post hoc de Sidak,  $p < 0,05$ .

Os animais tratados com a cafeína foram capazes de aumentar a atividade locomotora espontânea comparando-se ao grupo controle (Etanol + Caf [ $23,7 \pm 1,36$ ] vs Controle [ $14,8 \pm 1,01$ ], \*\*\*)  $p < 0,001$ ) e ao grupo etanol (Etanol + Caf [ $23,7 \pm 1,36$ ] vs Etanol [ $5,72 \pm 1,44$ ], +++)  $p < 0,001$ ) (**figura 22 A**), indicando que cafeína é capaz de promover melhora na atividade motora motivacional frente ao etanol. Além disso, não houve diferença estatística na distância total percorrida entre o grupo cafeína comparando-se ao grupo controle (Caf [ $18,9 \pm 1,92$ ] vs Controle [ $14,8 \pm 1,01$ ],  $p > 0,05$ ) **figura 22 (A)**.

#### 4.1.2. O antagonismo seletivo dos receptores $A_{2A}$ melhorou a atividade locomotora espontânea após *binge drinking* etanol

Na participação do receptores de ADO  $A_{2A}$ , demonstrou-se que os animais tratados com o antagonista seletivo  $A_{2A}$  foram capazes de aumentar a distância total percorrida comparando-se ao grupo controle (Controle [ $14,8 \pm 1,01$ ] vs Etanol + Ant [ $20,63 \pm 2,91$ ], \*  $p < 0,05$ ) e ao grupo etanol (Etanol + Ant [ $20,63 \pm 2,91$ ] vs Etanol [ $5,72 \pm 1,44$ ], +++)  $p < 0,001$ ) **figura 23 (A)**. Além disso, o grupo de animais tratados apenas com o antagonista seletivo  $A_{2A}$  foi capaz de aumentar a distância total percorrida comparando-se ao grupo controle (Controle [ $14,8 \pm 1,01$ ] vs Ant [ $21,7 \pm 1,65$ ], \*  $p < 0,05$ ) **figura 23 (A)**.





**Figura 23-** Efeitos da SCH58261 (0,1 mg/kg/dia) (A) um antagonista de  $A_{2A}$  após *binge drinking* etanol (3,0 g/kg/dia; 3 dias on - 4 dias off) no TCA da adolescência à idade adulta de ratos fêmeas no parâmetro distância total percorrida. (B) Parcelas ocupacionais da trilha dos animais na arena de CA. Os valores foram obtidos como média  $\pm$  e.p.m de  $n = 8-10$  animais por grupo,  $n = 7-10$  (A). Os dados foram significativos comparando: (A) Controle vs Etanol (\*\*  $p < 0,01$ ), Etanol + Ant vs Controle (\*  $p < 0,05$ ), Ant vs Controle (\*  $p < 0,05$ ) e Etanol + Ant vs Etanol (+++  $p < 0,001$ ). Todos os testes foram submetidos à ANOVA one-way seguida do teste post hoc de Sidak,  $p < 0,05$ .

Estes resultados sugerem que o receptor  $A_{2A}$ , está envolvido nos mecanismos de interação entre etanol e ADO na avaliação motora e possivelmente nos aspectos motivacionais, uma vez que o bloqueio seletivo dos receptores  $A_{2A}$  promoveu aumento na distância total percorrida frente ao etanol, bem como o próprio bloqueio é capaz de induzir estimulações motoras.

Os resultados motores foram extraídos dos *plots* obtidos da **figura 22 e 23 (B)**, que mostram o trajeto dos animais no teste do campo aberto. Observa-se que o grupo etanol apresentou um trajeto menor comparando-se ao grupo controle (Controle vs Etanol), os animais tratados com cafeína ao etanol apresentaram um trajeto maior

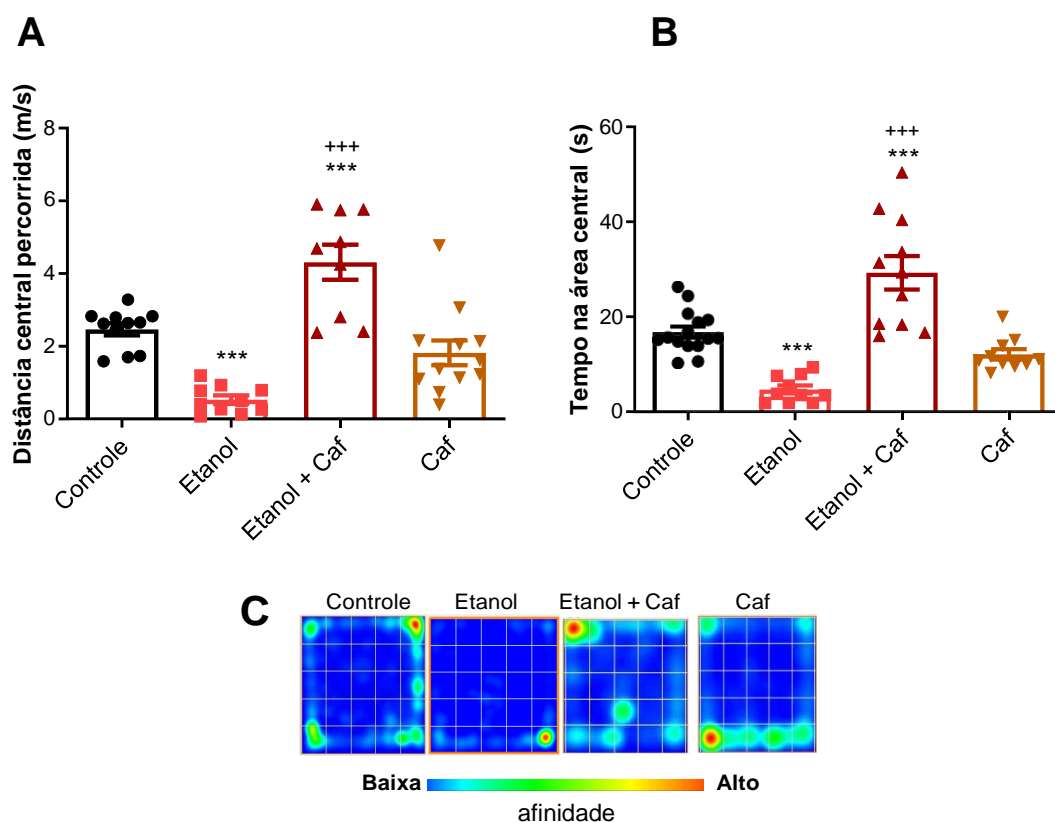
comparando-se o grupo controle (Controle *vs* Etanol + Caf) e o grupo etanol (Etanol + Caf *vs* Etanol). Os grupos tratados apenas com cafeína foram equivalentes ao grupo controle (Controle *vs* Caf). Por outro lado, na participação dos receptores de ADO A<sub>2A</sub>, **figura 23 (B)**, observa-se que o antagonista seletivo A<sub>2A</sub> foi capaz de aumentar a deambulação dos animais frente ao etanol (Etanol + Ant *vs* Ant) e ao grupo controle (Controle *vs* Ant), confirmando os dados previamente expostos.

## 4.2. TESTES COMPORTAMENTAIS DE EMOCIONALIDADE

### 4.2.1. A cafeína diminui o comportamento do tipo-ansiedade induzido pelo binge drinking etanol no teste do campo aberto e LCE

A intoxicação por 4 ciclos de etanol em padrão *binge* (3g/kg/dia, v.o), reduziu o parâmetros de distância central percorrida (m) (**Figura 24 - painel A**) e o tempo na área central (s) (**Figura 24 -painel B**) comparado ao grupo controle na distância (Controle [2,46 ± 0,16] *vs* Etanol [ 0,53 ± 0,11], \*\*\* p < 0,001, **figura 24A**) e no tempo (Controle [ 16,7 ± 1,14] *vs* Etanol [4,67 ± 0,86], \*\*\* p < 0,001, **figura 24B**), indicando que o etanol promoveu comportamento de tipo-ansiosgênico.

Os animais tratados com a cafeína associado ao etanol melhoraram os parâmetros de emocionalidade comparando-se ao grupo controle, na distância central (Etanol + Caf [4,31 ± 0,48] *vs* Controle [2,46 ± 0,16], \*\*\* p < 0,001, **figura 24A**) e no tempo na área central (Etanol + Caf [ 29,2 ± 3,53] *vs* Controle [ 16,7 ± 1,14], \*\*\* p < 0,001, **figura 24B**), bem como aumentou a distância central (Etanol + Caf [4,31 ± 0,48] *vs* Etanol [0,53 ± 0,11], +++ p < 0,001, **figura 24A**) e o tempo na área central (Etanol + Caf [ 29,2 ± 3,53] *vs* Etanol [4,67 ± 0,86], +++ p < 0,001, **figura 24B**) comparando-se ao grupo etanol, indicando que a cafeína evita o comportamento do tipo-ansiosgênico frente ao etanol. Além disso, não houve diferença estatística em ambos parâmetros de emocionalidade entre o grupo controle e o grupo tratado apenas com cafeína na distância central (Controle [2,46 ± 0,16] *vs* Caf [1,81 ± 0,34], p > 0,05, **figura 24A**) e no tempo na área central (Controle [16,7 ± 1,14] *vs* Caf [ 12,1 ± 1,09], p > 0,05, **figura 24B**), o que sugere que a cafeína *per se* nas doses utilizadas não produziu efeito do tipo ansiosgênico.



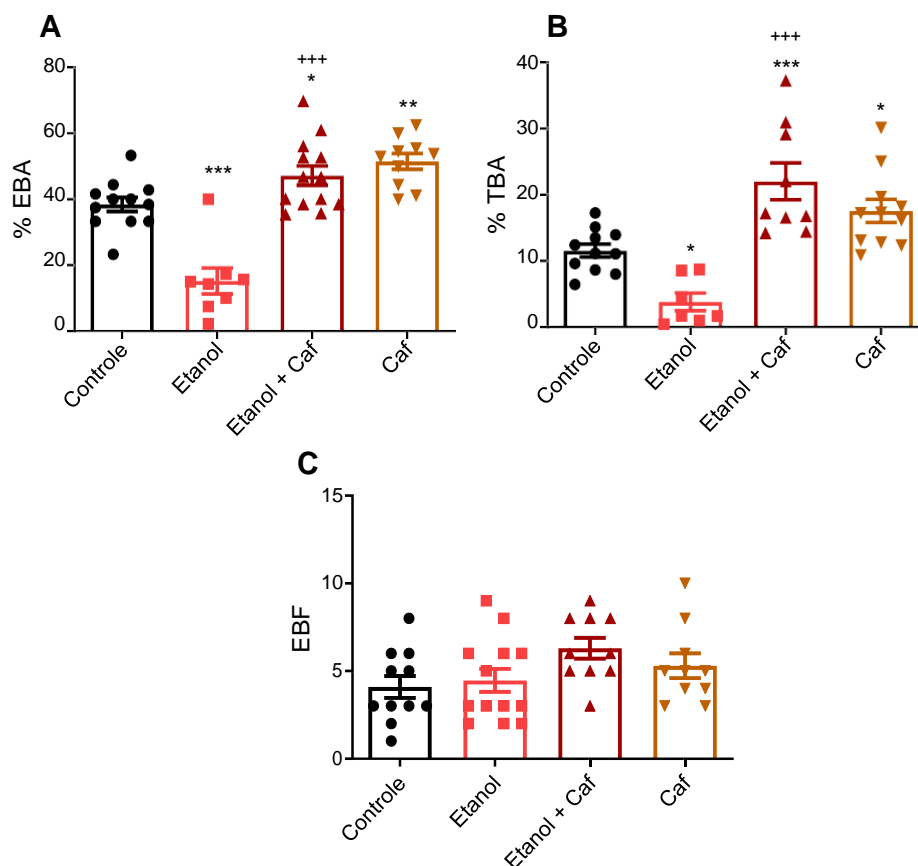
**Figura 24-** Efeitos da (A e B) cafeína (10 mg/kg/dia) após o *binge drinking* etanol (3,0 g/kg/dia; 3 dias on -4 dias off) no TCA da adolescência à idade adulta de ratos fêmeas sobre o parâmetro distância central percorrida e tempo de permanência na área central. (C) Parcelas de afinidade no centro e periferia na arena de CA. Os valores foram obtidos como média  $\pm$  e.p.m de  $n = 9-12$  animais por grupo (A) e de (B)  $n = 7-11$  animais por grupo. Os dados foram significativos comparando: (A) Controle vs Etanol (\*\* $p < 0,001$ ), Etanol + Caf vs Controle (\*\* $p < 0,001$ ) e Etanol + Caf vs Etanol (++ $p < 0,001$ ); (B) Controle vs Etanol (\*\* $p < 0,001$ ), Etanol + Caf vs Controle (\*\* $p < 0,001$ ), e Etanol + Caf vs Etanol (++ $p < 0,001$ ). Todos os testes foram submetidos à ANOVA one-way seguida do teste post hoc de Sidak,  $p < 0,05$ .

Os resultados dos parâmetros de emocionalidade no teste do campo aberto foram extraídos dos *plots* obtidos da **figura 24(C)**, que mostram a taxa de afinidade na área central e periférica dos animais, a partir do videomonitoramento da arena. Observou-se que o grupo etanol apresentou uma alta afinidade pela área periférica comparando-se ao grupo controle (Controle vs Etanol), os animais tratados com cafeína associado ao etanol apresentaram uma alta afinidade pela área central comparando-se o grupo controle

(Controle vs Etanol + Caf) e ao grupo etanol (Etanol + Caf vs Etanol). Os grupos tratados apenas com cafeína foram equivalentes ao grupo controle (Controle vs Caf).

No LCE, após a intoxicação por 4 ciclos de etanol em padrão *binge* (3g/kg/dia, v.o), demonstrou-se que nos parâmetros de porcentagens de entradas nos braços abertos (%EBA) (**Figura 25 -painel A**) e no (%TBA) tempo de permanência nos braços abertos (**Figura 25 - painel B**) que o grupo etanol foi capaz de reduzir de maneira significativa estes parâmetros comparando-se ao grupo controle [%EBA (Controle [38,4 ± 2,13] vs Etanol [15,2 ± 3,95], \*\*\* p < 0,001, **figura 25A**; %TBA (Controle [ 11,5 ± 0,98] vs Etanol [3,80 ± 1,33], \* p < 0,05, **figura 25B**)], indicando que o etanol é capaz de promover comportamento de tipo-ansiosgênico e que corroboram com os resultados encontrados no teste do campo aberto.

Os animais tratados com a cafeína e expostos ao etanol aumentaram ambos os parâmetros de emocionalidade comparando-se ao grupo controle [%EBA (Etanol + Caf [47,1 ± 2,95] vs Controle [38,4 ± 2,13], \* p < 0,05, **figura 25A**); %TBA (Etanol + Caf [ 22,03 ± 2,79] vs Controle [ 11,5 ± 0,98], \*\*\* p < 0,001, **figura 25B**)]. Além disso, a cafeína associada ao etanol aumentou o %EBA e o %TBA quando comparado ao grupo etanol [%EBA (Etanol + Caf [47,1 ± 2,95] vs Etanol [15,2 ± 3,95], \*\*\* p < 0,001, **figura 25A**); %TBA (Etanol + Caf [22,03 ± 2,79] vs Etanol [3,80 ± 1,33], \* p < 0,05, **figura 25B**)], indicando que a cafeína reverte o comportamento do tipo-ansiosgênico induzido pelo etanol, de maneira semelhante ao teste do campo aberto.



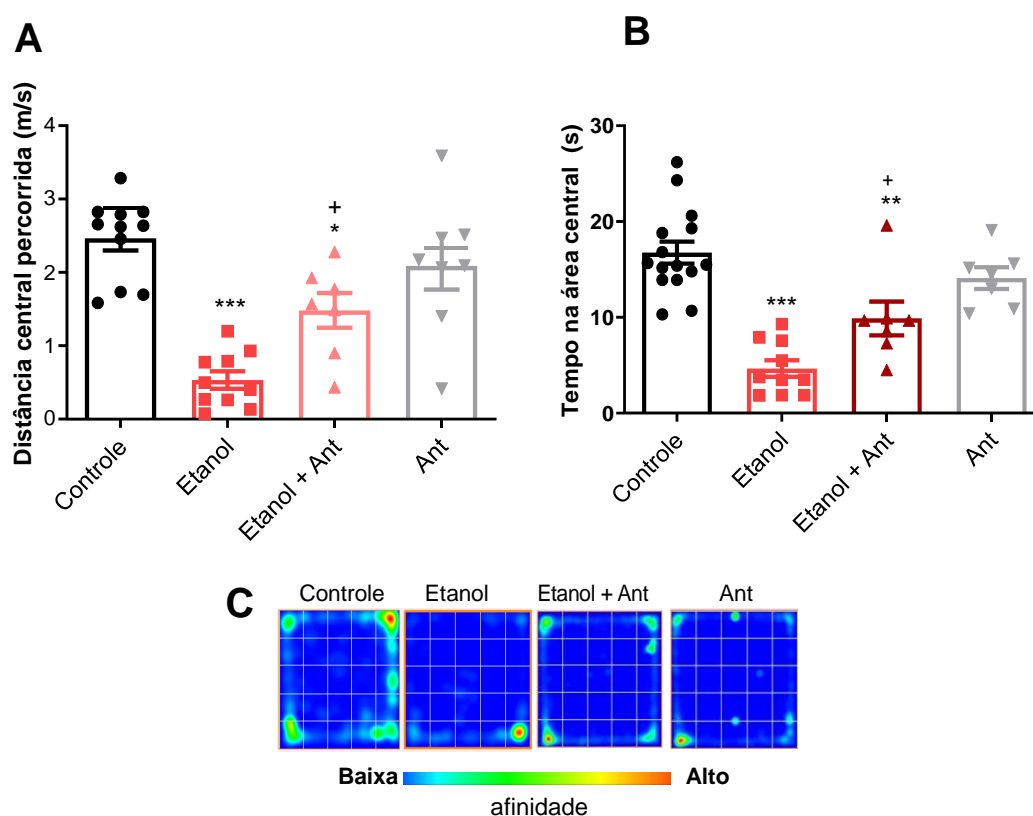
**Figura 25:** Efeitos da cafeína (10 mg/kg/dia) após o *binge* drinking etanol (3,0 g/kg/dia; 3 dias on -4 dias off) no teste de LCE da adolescência à idade adulta de ratos fêmeas na % de entradas de braços abertos (**A**) e no parâmetro % de tempo de braços abertos (**B**). Os valores foram obtidos como média ± e.p.m de n = 8-12 animais por grupo (**A**) e (**B**), n = 10-13 (**C**). Os dados foram significativos comparando: (**A**) Controle vs Etanol (\*\*\*) p < 0,001), Etanol + Caf vs Controle (\* p < 0,05), Caf vs Controle (\*\* p < 0,01), e Etanol + Caf vs Etanol (+++ p < 0,001). (**B**) Controle vs Etanol (\* p < 0,05), Etanol + Caf vs Controle (\*\*\*) p < 0,001), Caf vs Controle (\* p < 0,05), e Etanol + Caf vs Etanol (+++ p < 0,001). Os dados (**C**) não foram significativos. Todos os testes foram submetidos à ANOVA one-way seguida do teste post hoc de Sidak, p < 0,05.

Observou-se também, que os grupos tratados apenas com cafeína aumentaram os parâmetros comparando-se ao grupo controle [%EBA (Controle [38,4 ± 2,13] vs Caf [51,49 ± 2,39], \*\* p < 0,01. **Figura 25A**; %TBA (Controle [11,5 ± 0,98] vs Caf [17,5 ± 1,74], \* p < 0,05, **figura 25B**)], indicando que em baixas doses a cafeína *per se* é capaz de induzir comportamento do tipo-ansiolítico.

Considerando o parâmetro de números absolutos nos braços fechados (EBF), observou-se que entre os grupos não houve diferenças significantes entre os tratamentos, e que, portanto, a função motora dos animais não estava comprometida (**Figura 25C**).

#### 4.2.2. O antagonismo seletivo dos receptores A<sub>2A</sub> atenua o comportamento semelhante à ansiedade exibido pelo protocolo de binge drinking etanol.

Na participação dos receptores de ADO A<sub>2A</sub> sobre os parâmetros de emocionalidade, observou-se que os animais expostos ao etanol e tratados com o antagonista seletivo A<sub>2A</sub> aumentaram a distância central comparado ao grupo etanol (Etanol + Ant vs Etanol, +  $p < 0,05$ , **figura 26A**) e o tempo na área central (Etanol + Ant vs Etanol, +  $p < 0,05$ , **figura 26B**) comparando-se ao grupo etanol, porém, não foi suficiente para atingir os níveis do animal controle, tanto na distância total percorrida (Controle [ $2,46 \pm 0,16$ ] vs Etanol + Ant [ $1,482 \pm 0,23$ ], \*  $p < 0,05$ , **figura 26A**) quanto no tempo na área central (Controle [ $16,7 \pm 1,14$ ] vs Etanol + Ant [ $9,90 \pm 1,77$ ], \*\*  $p < 0,01$ , **figura 26B**).



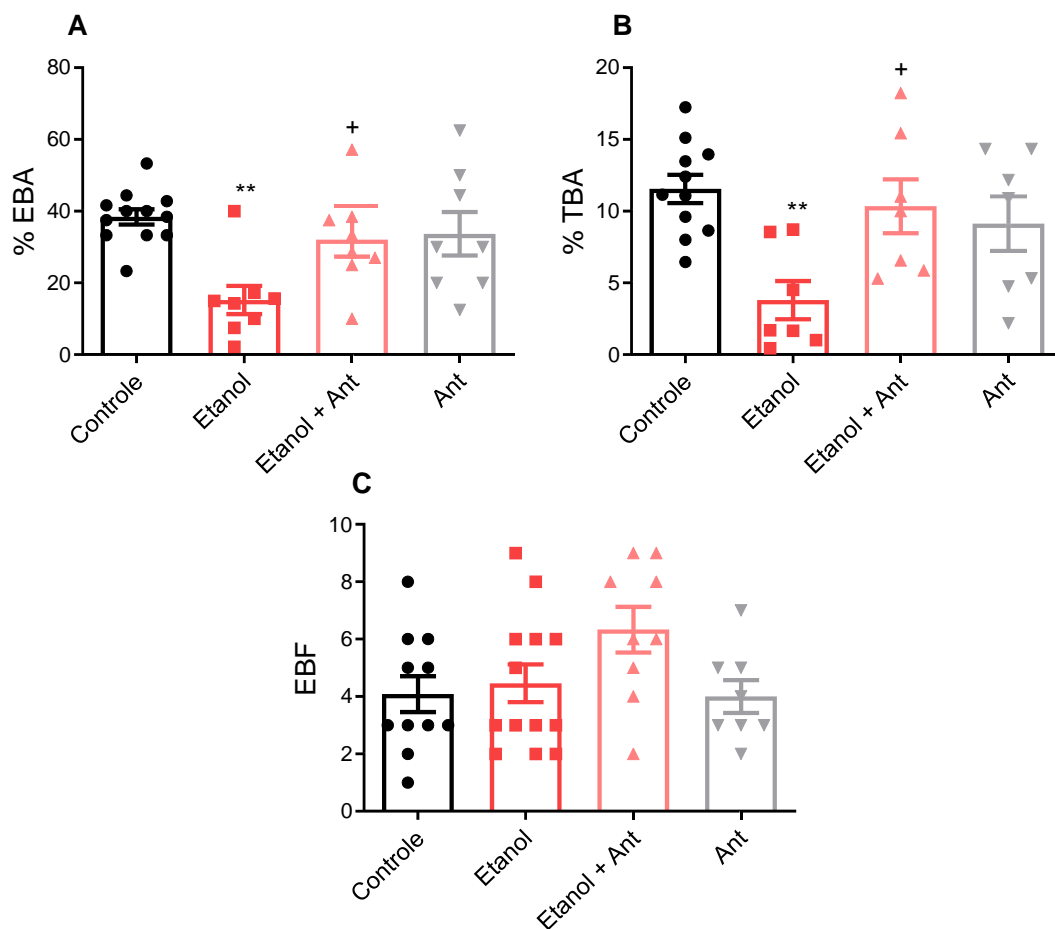
**Figura 26:** Efeitos de SCH58261 (0,1 mg/kg/dia) um antagonista de A<sub>2A</sub> após o *binge drinking* etanol (3,0 g/kg/dia; 3 dias on -4 dias off) no TCA da adolescência à idade adulta de ratos fêmeas sobre o parâmetro distância central percorrida (**A**) e tempo de permanência no centro (**B**). (**C**) Parcelas de afinidade no centro e periferia na arena de CA. Os valores foram obtidos como média ± e.p.m de n = 7-11 animais por grupo e

em **(B)** e  $n = 7-15$ . Os dados foram significativos comparando: **(A)** Controle vs Etanol (\*\*\*  $p < 0,001$ ), Etanol + Ant vs Controle (\*  $p < 0,05$ ), e Etanol + Ant vs Etanol (+  $p < 0,05$ ). **(B)** Controle vs Etanol (\*\*\*  $p < 0,001$ ), Controle vs Etanol + Ant (\*\*  $p < 0,01$ ), e Etanol + Ant vs Etanol (+  $p < 0,05$ ). Todos os testes foram submetidos à ANOVA one-way seguida do teste post hoc de Sidak,  $p < 0,05$ .

Notadamente, não houve diferença estatística entre os grupos de animais tratados com o antagonista seletivo  $A_{2A}$  *per se* e o grupo controle tanto na distância central percorrida (Controle  $[2,46 \pm 0,16]$  vs Ant  $[2,08 \pm 0,32]$ ,  $p > 0,05$ , **figura 26A**) quanto no tempo na área central (Controle  $[16,7 \pm 1,14]$  vs Ant  $[14,1 \pm 1,13]$ ,  $p > 0,05$ , **figura 26B**).

Estes resultados sugerem que o receptor  $A_{2A}$  está envolvido nos mecanismos de interação entre etanol e ADO no comportamento do tipo-ansiosgênico, e que o bloqueio seletivo deste receptor indica a atenuação deste comportamento induzido pelo etanol. Na participação dos receptores de ADO  $A_{2A}$  (**figura 26C**), observou-se que o antagonista seletivo  $A_{2A}$  associado ao etanol apresentou alta afinidade pela área periférica comparando-se o grupo controle (Controle vs Etanol + Ant) e atenuação desta afinidade periférica comparando-se ao grupo etanol (Etanol + Ant vs Etanol). Os grupos tratados apenas com o antagonista foram equivalentes ao grupo controle (Controle vs Ant).

No LCE, observou-se que os animais tratados com o antagonista seletivo  $A_{2A}$  associado ao etanol não apresentaram diferença significativa em relação ao controle, porém amenizaram o comportamento do tipo ansiosgênico comparando-se ao grupo etanol no %EBA (Etanol + Ant  $[32,1 \pm 4,77]$  vs Etanol  $[15,2 \pm 3,95]$ , +  $p < 0,05$ , **figura 27A**) e no %TBA (Etanol + Ant  $[10,35 \pm 1,880]$  vs Etanol  $[3,808 \pm 1,338]$ , +  $p < 0,05$ , **figura 27B**).



**Figura 27:** Efeitos de SCH58261 (0,1 mg/kg/dia) um antagonista de  $A_{2A}$  após o *binge drinking* etanol (3,0 g/kg/dia; 3 dias on -4 dias off) no teste de LCE da adolescência à idade adulta de ratos fêmeas na % de entradas de braços abertos (A) no parâmetro % de tempo de braços abertos (B). Os valores foram obtidos como média  $\pm$  e.p.m de  $n = 7-11$  (A) e (B). Os dados foram significativos comparando: (A) Controle vs Etanol (\*\*  $p < 0,01$ ) e Etanol + Ant vs Etanol (+  $p < 0,05$ ). (B) Controle vs Etanol (\*\*  $p < 0,01$ ) e Etanol + Ant vs Etanol (+  $p < 0,05$ ). Os dados (C) não foram significativos. Todos os testes foram submetidos à ANOVA one-way seguida do teste post hoc de Sidak,  $p < 0,05$ .

Estes resultados indicam que os receptores  $A_{2A}$  estão envolvidos no comportamento ansiogênico causado pelo etanol, porém estes resultados não excluem a participação de outros receptores como  $A_1$  na via da ansiedade.

Considerando o parâmetro de números absolutos nos braços fechados (EBF), observou-se que entre os grupos não houve diferenças significantes entre os tratamentos, e que, portanto, a função motora dos animais não estava comprometida (Figura 27C).



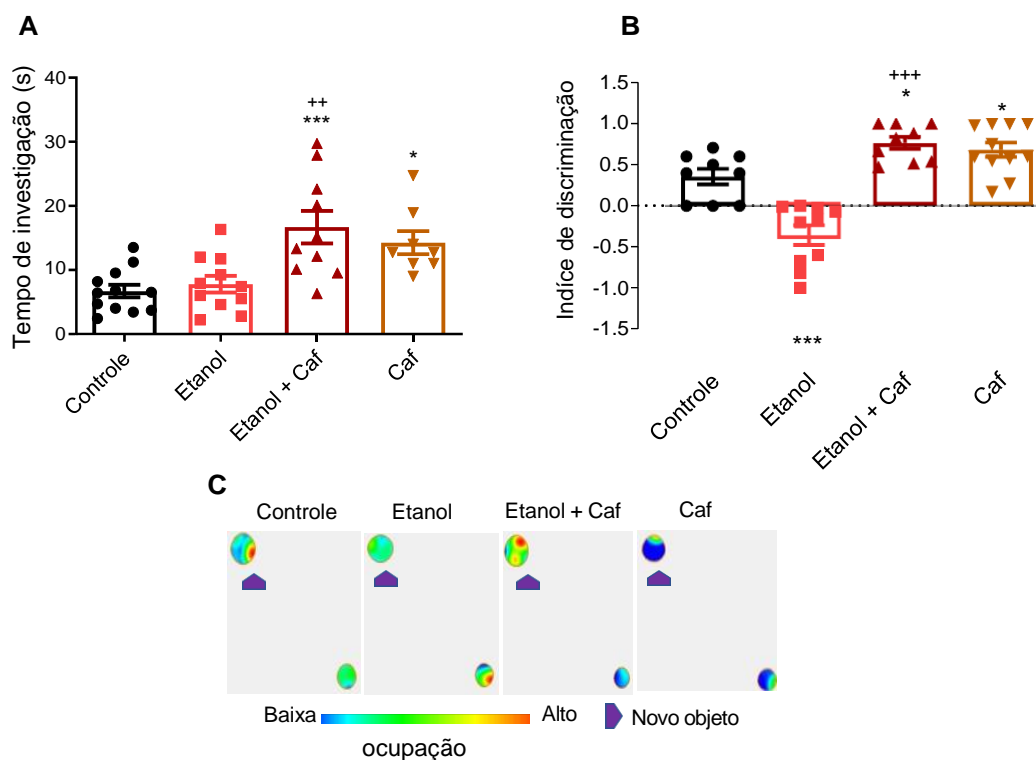
### 4.3. TESTES COGNITIVOS

#### 4.3.1. A cafeína recupera o comprometimento da memória de curto prazo induzido pelo consumo excessivo de etanol

Após a intoxicação por 4 ciclos de etanol em padrão *binge* (3g/kg/dia), demonstrou-se que não houve diferença no tempo de investigação quando comparado ao grupo controle (**Figura 28-painel A**). Porém, os animais que receberam 4 ciclos de etanol no período da adolescência apresentaram uma redução no índice de discriminação no novo objeto (Controle  $[0,35 \pm 0,09]$  vs Etanol  $[-0,35 \pm 0,11]$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , **figura 28B**), indicando que o etanol é capaz induzir alterações na memória de curta duração.

Os animais tratados com a cafeína associado ao etanol aumentaram o tempo de investigação (Controle  $[6,692 \pm 0,978]$  vs Etanol + Caf  $[16,68 \pm 2,53]$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , **figura 28A**) e o índice de discriminação do novo objeto (Controle  $[0,35 \pm 0,09]$  vs Etanol + Caf  $[0,76 \pm 0,07]$ , \*  $p < 0,05$ , **figura 28B**) comparado ao grupo controle. Observou-se, também que a cafeína associado ao etanol foi capaz de aumentar significativamente o tempo de investigação (Etanol + Caf  $[16,68 \pm 2,537]$  vs Etanol  $[7,782 \pm 1,288]$ , ++  $p < 0,01$ , **figura 28A**) e o índice de discriminação do novo objeto (Etanol + Caf  $[0,7658 \pm 0,073]$  vs Etanol  $[-0,35 \pm 0,11]$ , +++  $p < 0,001$ , **figura 28B**) quando comparado ao grupo etanol, indicando que a cafeína é capaz de reverter os danos de memória de curta duração induzido pelo etanol.

Observou-se, também, que os grupos tratados apenas com cafeína foram capazes de aumentar o tempo de investigação comparado ao grupo controle (Controle  $[6,692 \pm 0,9785]$  vs Caf  $[14,25 \pm 1,815]$ , \*  $p < 0,05$ . **Figura 28A**), assim como o índice discriminatório do novo objeto (Controle  $[0,3562 \pm 0,09474]$  vs Caf  $[0,6834 \pm 0,08864]$ , \*  $p < 0,05$ , **figura 28B**), indicando que a cafeína *per se* é capaz de promover efeitos sobre a memória de curta duração.

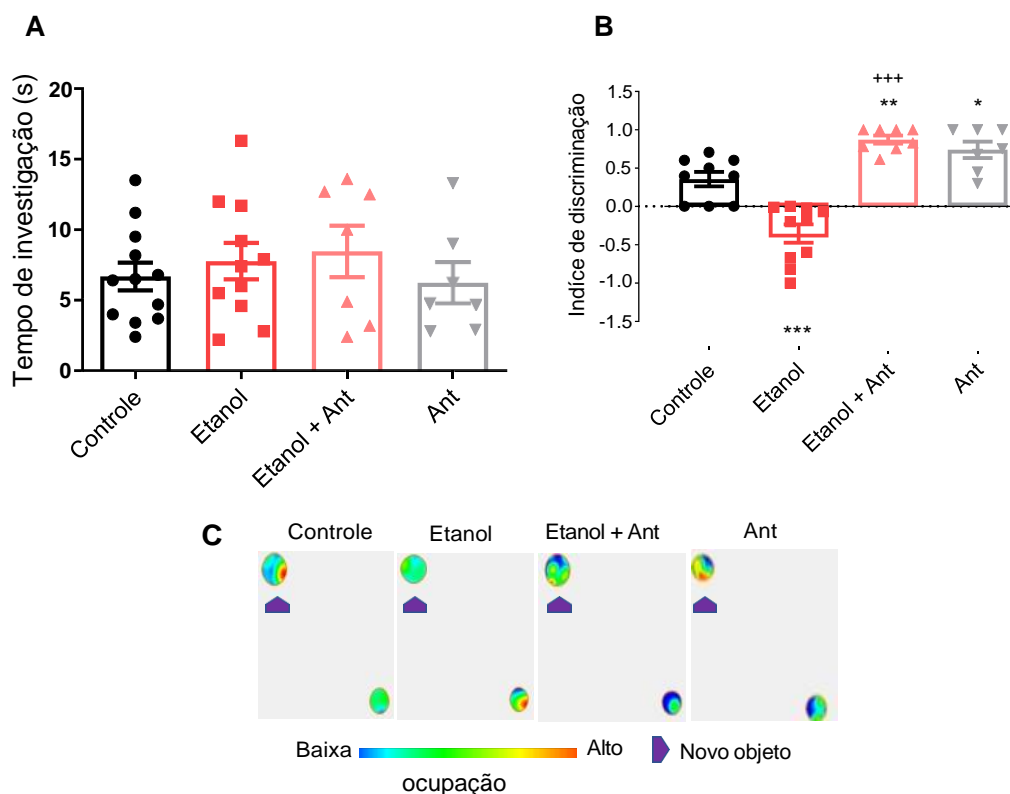


**Figura 28:** Efeitos da cafeína (10 mg/kg/dia) após o *binge* drinking etanol (3,0 g/kg/dia; 3 dias on -4 dias off) no teste de reconhecimento de objetos da adolescência à idade adulta de ratos fêmeas sobre o tempo de investigação (fase de treinamento) (**A**) e no teste de reconhecimento de objetos no índice de discriminação (fase de discriminação) (**B**). (**C**) taxas ocupacionais sobre o novo objeto. Os valores foram obtidos como média  $\pm$  e.p.m de  $n = 8-12$  animais por grupo (**A**) e  $n = 9-11$  (**B**). Os dados foram significativos comparando: (**A**) Etanol + Caf vs Controle (\*\* $p < 0,001$ ), Caf vs Controle (\*  $p < 0,05$ ) e Etanol + Caf vs Etanol (++)  $p < 0,01$ ). (**B**) Controle vs Etanol (\*\* $p < 0,001$ ), Etanol + Caf vs Controle (\*  $p < 0,05$ ), Caf vs Controle (\*  $p < 0,05$ ), e Etanol + Caf vs Etanol (+++  $p < 0,001$ ). Todos os testes foram submetidos à ANOVA one-way seguida do teste post hoc de Sidak,  $p < 0,05$ .

Os resultados dos parâmetros cognitivos foram extraídos dos *plots* obtidos da **figura 28(C)**, que mostram o índice de discriminação do novo objeto dos animais, a partir do videomonitoramento da arena. Observou-se que o grupo etanol apresentou uma menor afinidade pelo novo objeto comparando-se ao grupo controle (Controle vs Etanol), os animais tratados com cafeína associado ao etanol apresentaram uma alta afinidade pelo novo objeto comparando-se o grupo controle (Controle vs Etanol + Caf) e ao grupo etanol (Etanol + Caf vs Etanol). Os grupos tratados apenas com cafeína aumentaram a afinidade pelo novo objeto comparando-se ao grupo controle (Controle vs Caf).

### 4.3.2. O bloqueio dos receptores A<sub>2A</sub> medeia os efeitos na memória de curto prazo da Caf no paradigma binge drinking etanol.

Na participação do receptores de ADO A<sub>2A</sub> sobre os parâmetros cognitivos, observou-se que os animais tratados com o antagonista seletivo A<sub>2A</sub> associado ao etanol não apresentaram diferença significativa em relação aos grupos no tempo de investigação (**Figura 29A**), porém aumentaram o índice discriminatório do novo objeto quando comparado ao grupo controle (Controle [0,3562 ± 0,09474 ] vs Etanol + Ant [0,8719 ± 0,05303 ], \*\* p < 0,01, **figura 29B**) e ao grupo etanol (Etanol + Ant [0,8719 ± 0,05303 ] vs Etanol [ -0,3552± 0,1197 ], +++ p < 0,001,**figura 29B**). Estes resultados indicam que o receptor A<sub>2A</sub> contribui de forma robusta na melhora cognitiva dos danos causados pelo etanol. Observou-se, também, que o antagonista *per se* é capaz de promover um aumento no índice discriminatório (Controle [0,3562 ± 0,09474] vs Ant [0,7395 ± 0,1077], \* p < 0,05, **figura 29B**).



**Figura 29:** Efeitos de SCH58261 (0,1 mg/kg/dia) um antagonista de A<sub>2A</sub> após o *binge drinking* etanol (3,0 g/kg/dia; 3 dias on -4 dias off) no teste de reconhecimento de objetos da adolescência à idade adulta de ratos fêmeas sobre o tempo de investigação (fase de treinamento) (**A**) e no índice de discriminação (fase de

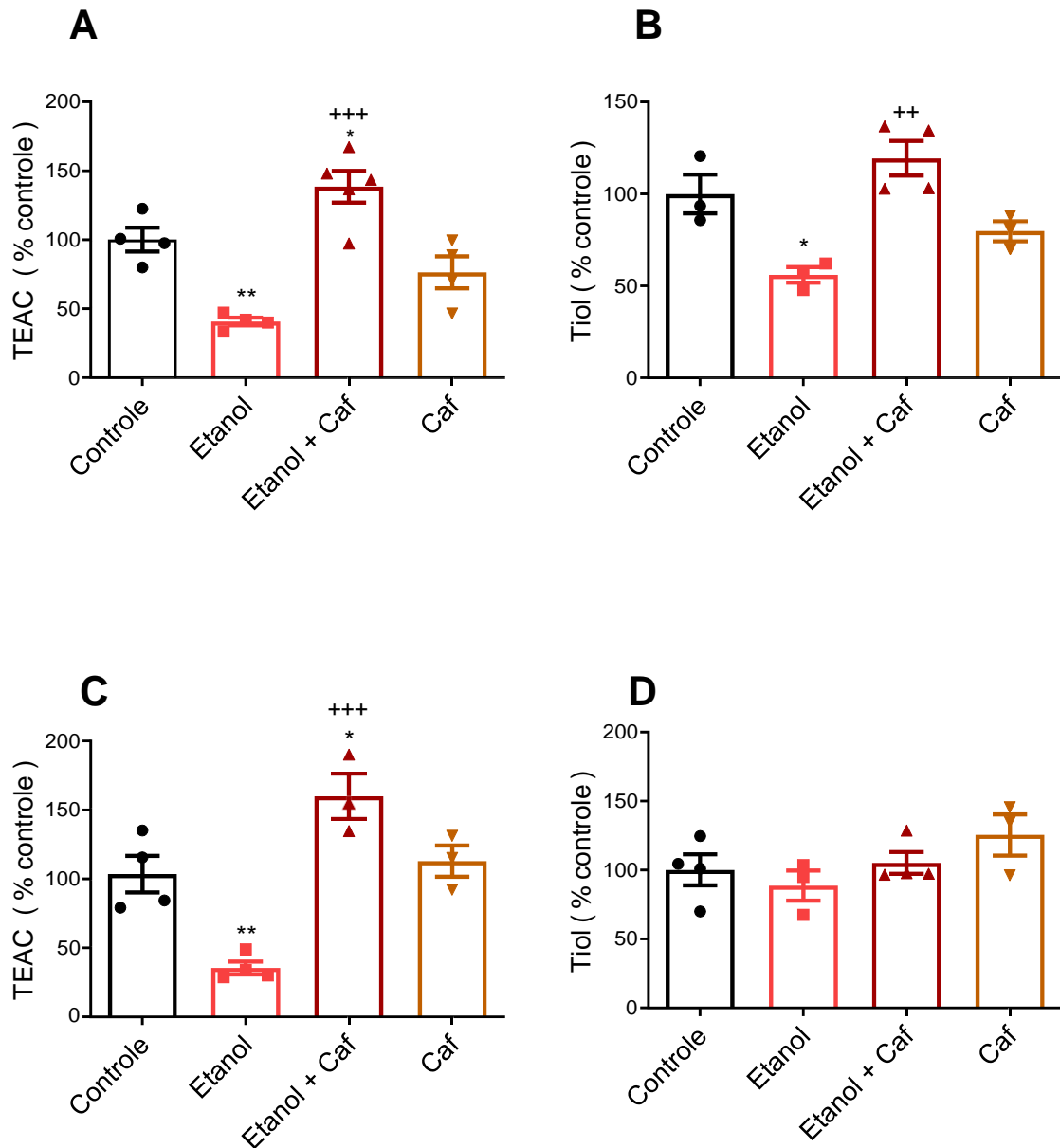
discriminação) **(B)**. **(C)** taxas ocupacionais sobre o novo objeto. Os valores foram obtidos como média  $\pm$  e.p.m de  $n = 7-12$  **(B)** e  $n = 7-10$  **(D)**. Os dados foram significativos comparando: **(A)** os dados não foram significativos. **(B)** Controle vs Etanol (\*\* $p < 0,001$ ), Etanol + Ant vs Controle (\*\* $p < 0,01$ ), Ant vs Controle ( $p < 0,05$ ) e Etanol + Ant vs Etanol (+++ $p < 0,001$ ). Todos os testes foram submetidos à ANOVA one-way seguida do teste post hoc de Sidak,  $p < 0,05$ .

Na participação dos receptores de adenosina  $A_{2A}$ , **figura 29(C)**, observou-se que o antagonista seletivo  $A_{2A}$  associado ao etanol apresentou maior afinidade pelo novo objeto comparado ao grupo controle (Controle vs Etanol + Ant), bem como comparando-se ao grupo etanol (Etanol + Ant vs Etanol). Os grupos tratados apenas com o antagonista *per se* aumentaram a afinidade pelo novo objeto comparando-se ao grupo controle (Controle vs Ant).

#### 4.4. ENSAIOS BIOQUÍMICOS NO CPF E HIP

##### 4.4.1. A cafeína aumenta o sistema antioxidante não enzimático no CPF e no HIP

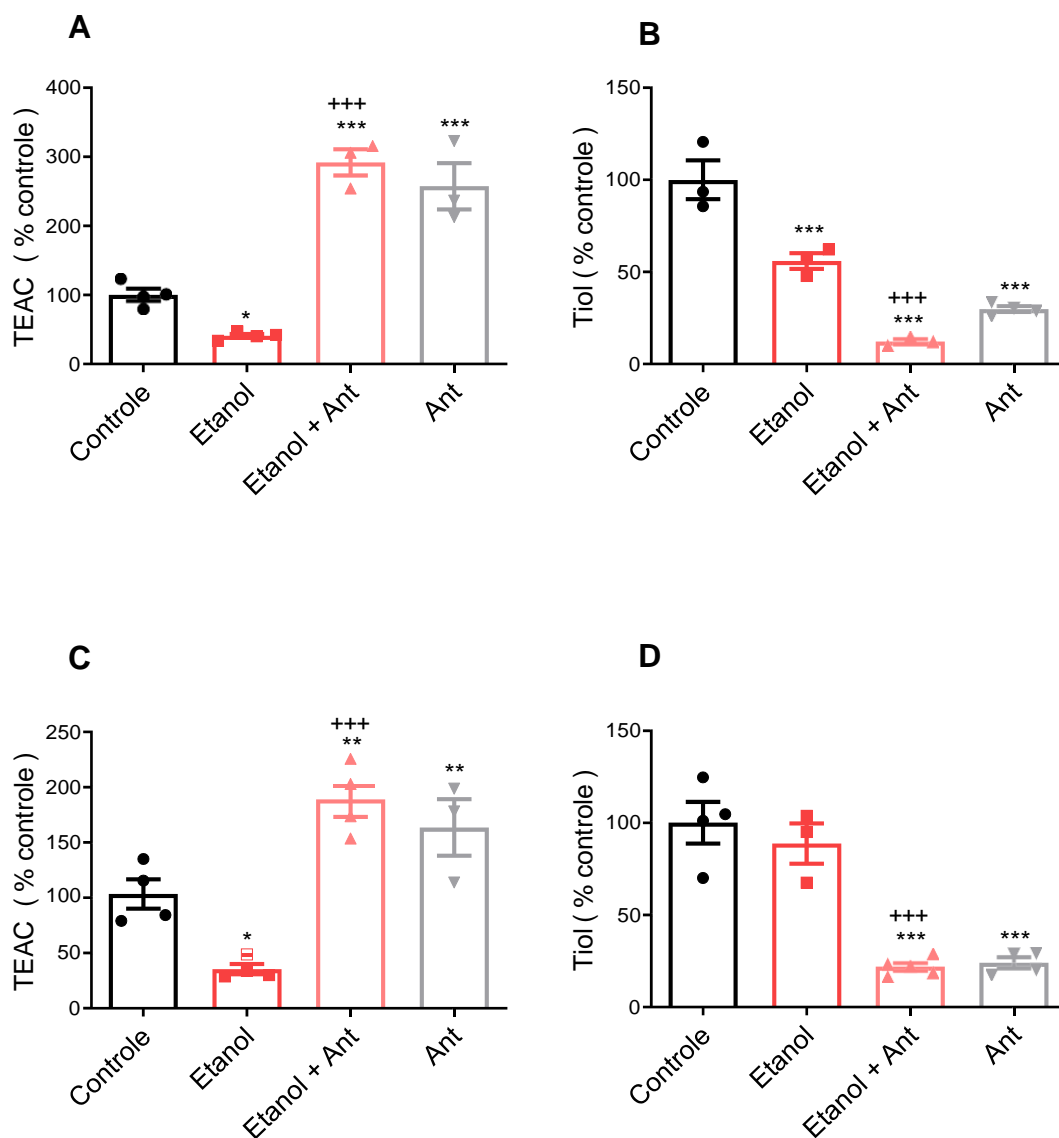
Ensaio antioxidante do sistema não enzimático foram realizados pelos níveis de TEAC e tióis (GSH). A **Fig. 30 A e B** mostra que a exposição ao etanol reduziu os níveis de TEAC e tiol no CPF (TEAC: Etanol [ $40,7 \pm 2,82$ ] vs Controle [ $100 \pm 8,71$ ], \*\* $p < 0,01$ ; tiol (GSH): Etanol [ $55,9 \pm 4,25$ ] vs Controle [ $100 \pm 10,57$ ], \* $p < 0,05$ ). No HIP, o TEAC também foi reduzido (Etanol [ $35,4 \pm 4,62$ ] vs Controle [ $100 \pm 13,2$ ], \* $p < 0,05$ , **fig. 30 C**), mas não os níveis de tiol (GSH) (**fig. 30D**). A administração de cafeína restaurou os parâmetros antioxidantes diminuídos pelo protocolo de etanol, aumentando os níveis de TEAC e tiol (GSH) no CPF (TEAC: Etanol [ $40,7 \pm 2,82$ ] vs Etanol + Caf [ $138,5 \pm 11,4$ ], +++ $p < 0,001$ ; **fig. 30A**; tiol (GSH): Etanol [ $55,9 \pm 4,25$ ] vs Etanol + Caf [ $119,3 \pm 9,43$ ], ++ $p < 0,01$ ; **fig.30B**), bem como de TEAC no HIP (Etanol [ $35,4 \pm 9,24$ ] vs Etanol + Caf [ $159,8 \pm 16,1$ ], +++ $p < 0,001$ ; **fig. 30C**).



**Figura 30:** Efeitos da cafeína (10 mg/kg/dia) após o *binge drinking* etanol (3,0 g/kg/dia; 3 dias on-4 dias off) sobre o sistema antioxidante não enzimático no CPF (A e B) e HIP (C e D). (A) Efeitos de cafeína nos níveis de TEAC, n = 3-5; (B) Efeitos de cafeína nos níveis de Tiol, n = 3-4; (C) Efeitos de cafeína nos níveis de TEAC, n = 3-4; (D) Efeitos de cafeína nos níveis de Tiol, n = 3-4. Os dados foram significativos comparando: (A) Etanol vs Controle (\*\* p < 0,01), Etanol + Caf vs Controle (\* p < 0,05) e Etanol + Caf vs Etanol (+++ p < 0,001); (B) Etanol vs Controle (\* p < 0,05) e Etanol + Caf vs Etanol (++) p < 0,01); (C) Etanol vs Controle (\*\* p < 0,01), Etanol + Caf vs Controle (\* p < 0,05) e Etanol + Caf vs Etanol (+++ p < 0,001); (D) os dados não foram significativos. Todos os testes foram submetidos à ANOVA one-way seguida do teste post hoc de Sidak, p < 0,05.

#### 4.4.2. O bloqueio seletivo do receptor A<sub>2A</sub> medeia os efeitos da cafeína nos níveis de TEAC, mas não no conteúdo de tiol no CPF e no HIP

Na **fig. 31**, a ANOVA demonstrou que o bloqueio seletivo dos receptores A<sub>2A</sub> (grupo Ant) aumentou a capacidade antioxidante total induzida pelo tratamento com cafeína em animais expostos ao etanol no CPF (Etanol [40,7 ± 2,82] vs Etanol + Ant [291,7 ± 19,0], ++ + p < 0,001, **fig.31 A**), bem como no HIP (Etanol [35,4 ± 4,62] Etanol + Ant [189,0 ± 15,8], +++ p < 0,001, **fig. 31 C**). Tal incremento nos níveis de TEAC também foi observado em animais submetidos ao bloqueio farmacológico dos receptores A<sub>2A</sub> *per se* (CPF: Ant [257,3 ± 33,4] vs Controle [100 ± 8,71], \*\*\* p < 0,001; HIP: Ant [163,5 ± 25,6] vs Controle [100 ± 13,2], \* p < 0,05); **Fig. 31 A e C**),



**Figura 31:** Efeitos de SCH58261 (0,1 mg/kg/dia) um antagonista  $A_{2A}$  após o *binge drinking* etanol (3,0 g/kg/dia; 3 dias on-4 dias off) sobre o sistema antioxidante não enzimático no CPF (**A e B**) e HIP (**C e D**). (**A**) Efeitos de SCH58261 nos níveis de TEAC, n = 3-4; (**B**) Efeitos de SCH58261 nos níveis de Tiol, n = 3-4; (**C**) Efeitos de SCH58261 nos níveis de TEAC, n = 3-4; (**D**) Efeitos de SCH58261 nos níveis de Tiol, n = 3-5. Os dados foram significativos comparando: (**A**) Etanol vs Controle (\* p < 0,05), Etanol + Ant e Ant vs Controle (\*\*\*) p < 0,001) e Etanol + Ant vs Etanol (+++ p < 0,001); (**B**) Etanol, Etanol + Ant e Ant vs Controle (\*\*\*) p < 0,001), Etanol + Ant vs Etanol (+++ p < 0,001); (**C**) Etanol e Ant vs Controle (\* p < 0,05), Etanol + Ant vs Controle (\*\* p < 0,01) e Etanol + Ant vs Etanol (+++ p < 0,001); (**D**) Etanol + Ant e Ant vs Controle (\*\*\*) p < 0,001) e Etanol + Ant vs Etanol (+++ p < 0,001). Todos os testes foram submetidos à ANOVA one-way seguida do teste post hoc de Sidak, p < 0,05.

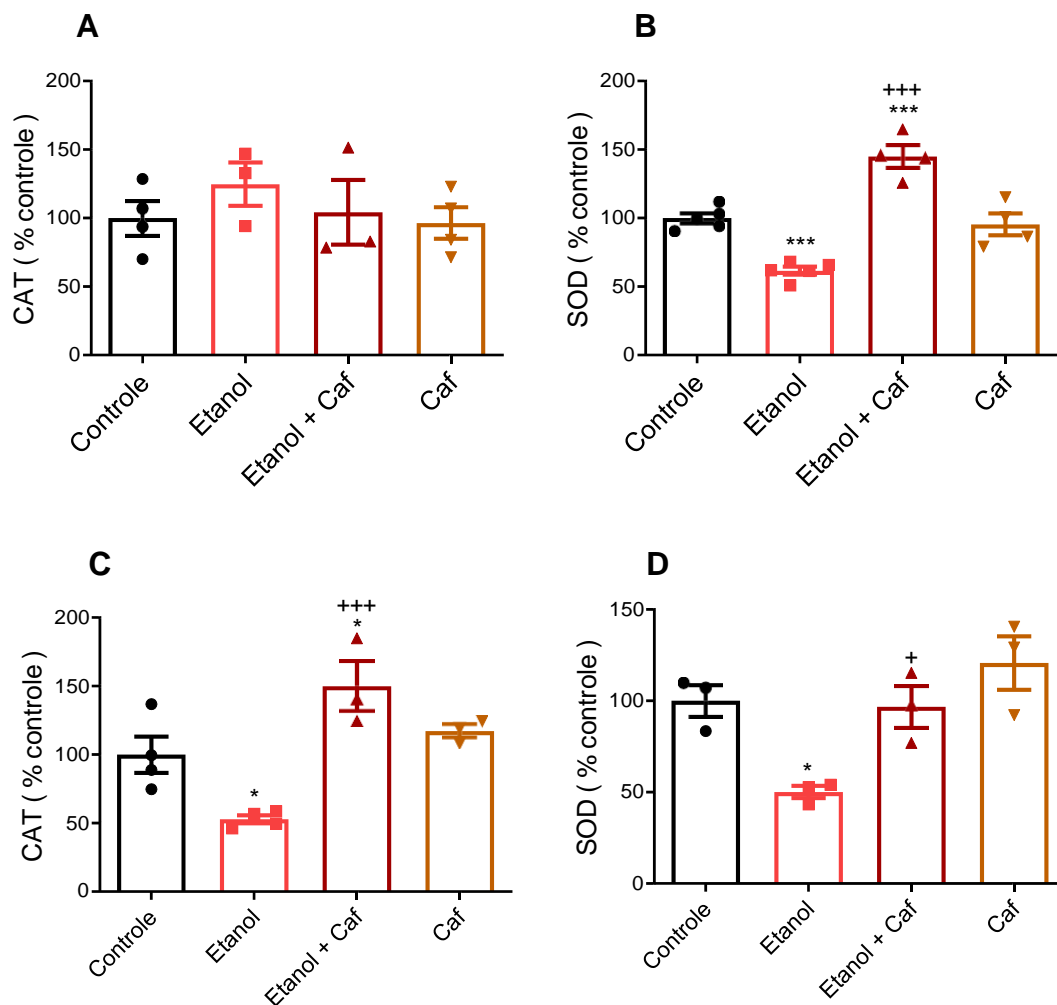
Em contraste, o aumento dos níveis de tiol encontrados na administração de cafeína não foi observado no tratamento com Ant dos animais submetidos à exposição

pelo etanol, visto que tanto no CPF quanto no HIP o conteúdo tecidual de tiol foi reduzido (CPF: Etanol  $[55,9 \pm 4,25]$  vs Etanol + Ant  $[12,2 \pm 1,36]$ , +++  $p < 0,01$ ; HIP (Etanol  $[88,7 \pm 10,92]$  vs Etanol + Ant  $[21,8 \pm 2,10]$ , +++  $p < 0,01$ ; **fig. 31B e D**). É importante notar que o grupo Ant *per se* reduziu teores de tiol no CPF (Ant  $[29,8 \pm 1,60]$  vs Controle  $[100 \pm 10,57]$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ) e HIP (Ant  $[24,1 \pm 2,93]$  vs Controle  $[100 \pm 11,2]$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ); **fig. 31B e D**).

#### 4.4.3. A cafeína aumenta o sistema enzimático antioxidante no CPF e no HIP

Ensaio antioxidantes do sistema enzimático foram realizados pelas atividades CAT e SOD. A **Fig 32B** mostra que a exposição ao etanol reduziu a atividade de SOD no CPF (Etanol  $[61,6 \pm 2,97]$  vs Controle:  $[100 \pm 3,61]$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ), mas não a atividade de CAT, **fig.32A**. Em contraste, a exposição ao etanol reduziu CAT e SOD no HIP (CAT: Etanol  $[52,8 \pm 2,93]$  vs Controle:  $[100 \pm 13,3]$ , \*  $p < 0,05$ ; SOD: Etanol  $[50,0 \pm 3,36]$  vs Controle:  $[100 \pm 8,29]$ , \* $p < 0,05$ , **fig.32C e D**). A administração de cafeína restaurou o sistema enzimático antioxidante reduzido pelo protocolo de etanol, aumentando a atividade da SOD no CPF (Etanol  $[61,6 \pm 2,97]$  vs Etanol + Caf  $[144,9 \pm 7,96]$ , +++  $p < 0,001$ ; **fig.32B**). No HIP, os níveis de CAT e SOD foram aumentados pela administração de cafeína (CAT: Etanol  $[52,8 \pm 2,93]$  vs Etanol + Caf  $[149,9 \pm 18,0]$ , +++  $p < 0,001$ ; SOD: Etanol  $[50,0 \pm 3,36]$  vs Etanol + Caf  $[96,6 \pm 11,1]$ , +++  $p < 0,001$ ; **fig. 32C e D**).



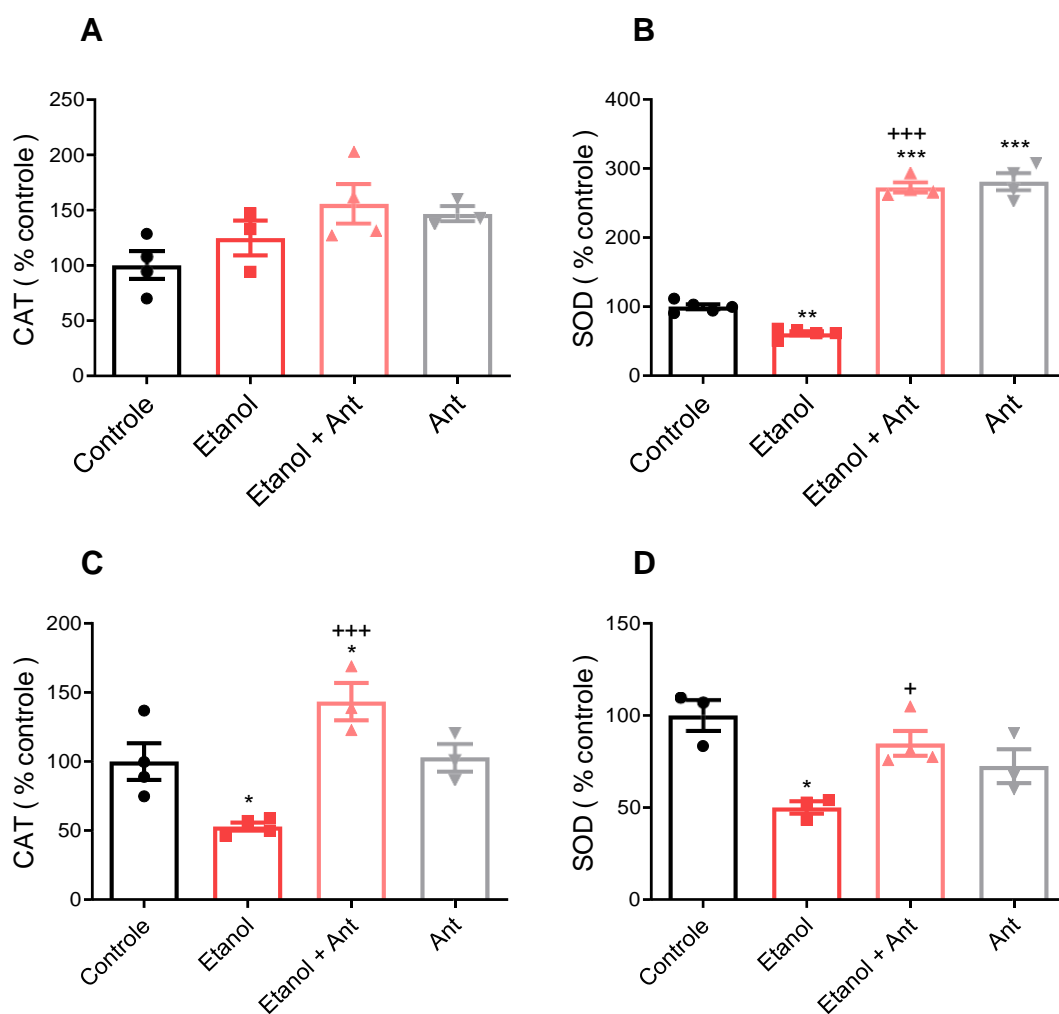


**Figura 32:** Efeitos da cafeína (10 mg/kg/dia) após o *binge* drinking etanol (3,0 g/kg/dia; 3 dias on-4 dias off) no sistema enzimático antioxidante no CPF (A e B) e HIP (C e D). (A) Efeitos de cafeína na atividade de CAT, n = 3-4; (B) Efeitos de cafeína na atividade de SOD, n = 4-5; (C) Efeitos de cafeína na atividade de CAT, n = 3-4; (D) Efeitos de cafeína na atividade de SOD, n = 3. Os dados foram significativos comparando: (A) os dados não foram significativos; (B) Etanol e Etanol + Caf vs Controle (\*\*\*) p < 0,001) e Etanol + Caf vs Etanol (+++ p < 0,001); (C) Etanol vs Controle (\* p < 0,05), Etanol + Caf vs Controle (\* p < 0,05) e Etanol + Caf vs Etanol (+++ p < 0,001); (D) Etanol vs Controle (\* p < 0,05) e Etanol + Caf vs Etanol (+ p < 0,05). Todos os testes foram submetidos a one-way ANOVA seguido do teste post hoc de Sidak, p < 0,05.

#### 4.4.4. O bloqueio seletivo do receptor A<sub>2A</sub> medeia os efeitos da cafeína na SOD no CPF, bem como na SOD e CAT no HIP.

A **fig. 33** mostra que o bloqueio seletivo dos receptores A<sub>2A</sub> está envolvido no aumento da atividade antioxidante enzimática da SOD induzida pelo tratamento com

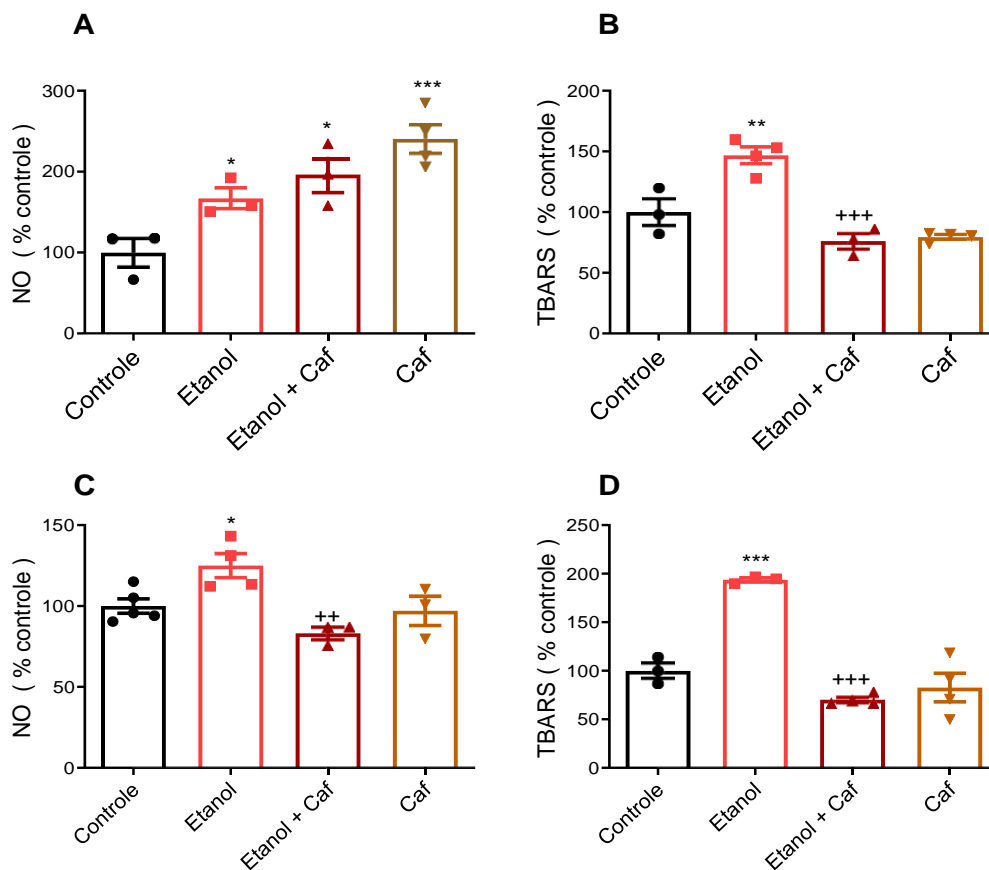
caféina em animais expostos ao etanol no CPF (Etanol [ $61,6 \pm 2,97$ ] vs Etanol + Ant [ $272,9 \pm 6,82$ ], +++p < 0,001, **fig.33B**). CAT e SOD (**fig. 33C e D**) também foram aumentados pelo bloqueio de receptores  $A_{2A}$  no HIP (CAT: Etanol [ $52,8 \pm 2,93$ ] vs Etanol + Ant [ $143,4 \pm 13,5$ ], +++ p < 0,001; SOD: Etanol [ $50,0 \pm 3,36$ ] vs Etanol + Ant [ $84,8 \pm 6,77$ ], + p < 0,05). Além disso, o grupo Ant *per se* aumentou a atividade da SOD no CPF (Ant [ $281,3 \pm 12,0$ ] vs Controle [ $100 \pm 3,61$ ], \*\*\* p < 0,001, **fig.33B**).



**Figura 33:** Efeitos de SCH58261 (0,1 mg/kg/dia) um antagonista de  $A_{2A}$  após o *binge drinking* etanol (3,0 g/kg/dia; 3 dias on-4 dias off) no sistema enzimático antioxidante no CPF (**A e B**) e HIP (**C e D**). (**A**) Efeitos de SCH58261 na atividade de CAT, n = 3-4; (**B**) Efeitos de SCH58261 na atividade de SOD, n = 4-5; (**C**) Efeitos de SCH58261 na atividade de CAT, n = 3-4; (**D**) Efeitos de SCH58261 na atividade de SOD, n = 3-4. Os dados não foram significativos (**A**); (**B**) Etanol vs Controle (\*\* p < 0,01), Etanol + Ant e Ant vs Controle (\*\*\* p < 0,001) e Etanol + Ant vs Etanol (+++ p < 0,001); (**C**) Etanol e Etanol + Ant vs Controle (\* p < 0,05) e Etanol + Ant vs Etanol (+++ p < 0,001); (**D**) Etanol vs Controle (\* p < 0,05) e Etanol + Ant vs Etanol (+ p < 0,05). Todos os testes foram submetidos a one-way ANOVA seguido do teste post hoc de Sidak, p < 0,05.

#### 4.4.5. A cafeína reduz os níveis de NO no HIP e de peroxidação lipídica no CPF e HIP

Ensaio oxidantes foram realizados para avaliar os efeitos da cafeína no dano oxidativo associados ao NO e TBARS. A **fig. 34** mostra que a exposição ao etanol induz ao estresse oxidativo, aumentando as espécies nitrogenadas e a peroxidação lipídica no CPF (NO: Etanol [ $166,9 \pm 12,9$ ] vs Controle [ $100 \pm 16,7$ ], \*  $p < 0,05$ ; **fig. 34A**; TBARS: Etanol [ $146,7 \pm 6,91$ ] vs Controle [ $100 \pm 10,8$ ], \*\*  $p < 0,01$ ; **fig. 34B**), bem como no HIP (NO: Etanol [ $139,7 \pm 18,1$ ] vs Controle [ $100 \pm 4,48$ ], \*  $p < 0,05$ ; **fig. 34C**; TBARS: Etanol [ $193,6 \pm 2,09$ ] vs Controle [ $100 \pm 7,65$ ], \*\*\*  $p < 0,001$ ; **fig. 34D**). O tratamento com cafeína não reduziu a superprodução de NO induzida pela exposição ao etanol no CPF, mas reduziu os níveis de peroxidação lipídica (Etanol [ $146,7 \pm 6,91$ ] vs Etanol + Caf [ $76,1 \pm 6,17$ ], +++  $p < 0,001$ ; **fig. 34A e B**). No HIP, a administração de cafeína reduziu os níveis de NO e TBARS (NO: Etanol [ $139,7 \pm 18,1$ ] vs Etanol + Caf [ $83,0 \pm 3,66$ ], \*  $p < 0,05$ ; **fig. 34C**; TBARS: Etanol [ $193,6 \pm 2,09$ ] vs Etanol + Caf [ $70,1 \pm 2,55$ ], +++  $p < 0,001$ ; **fig. 34D**).

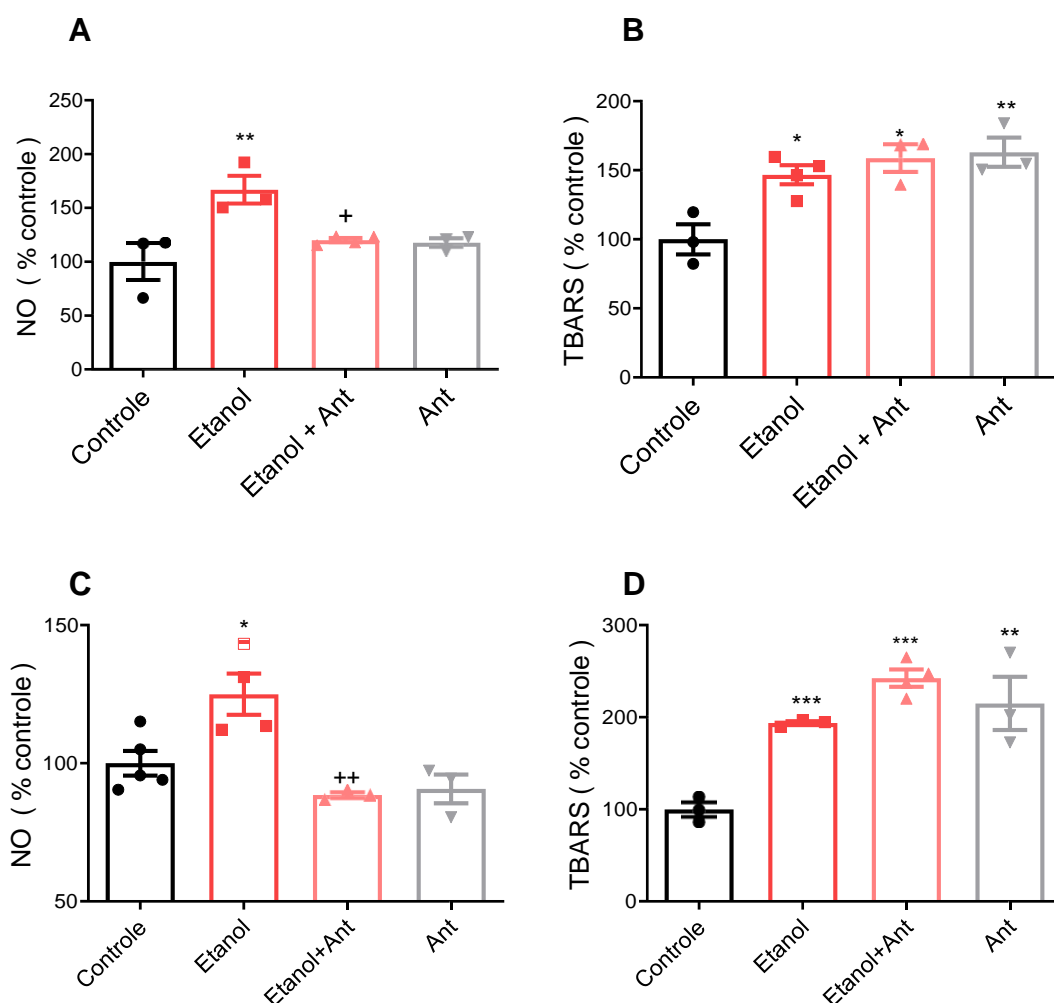


**Figura 34:** Efeitos da cafeína (10 mg/kg/dia) após o *binge drinking* etanol (3,0 g/kg/dia; 3 dias on-4 dias off) no sistema oxidante no CPF (**A e B**) e HIP (**C e D**). (**A**) Efeitos de cafeína nos níveis de NO, n = 3-4; (**B**) Efeitos de cafeína nos níveis de TBARS, n = 3-4; (**C**) Efeitos de cafeína nos níveis de NO, n = 3-5; (**D**) Efeitos de cafeína nos níveis de TBARS, n = 3-4. Os dados foram significativos comparando: (**A**) Etanol e Etanol + Caf vs Controle (\* p < 0,05) e Caf vs Controle (\*\*\* p < 0,001); (**B**) Etanol vs Controle (\*\* p < 0,01) e Etanol + Caf vs Etanol (+++ p < 0,001); (**C**) Etanol vs Controle (\* p < 0,05) e Etanol + Caf vs Controle (++) p < 0,01) e Etanol + Caf vs Etanol (+++ p < 0,001); (**D**) Etanol vs Controle (\*\*\* p < 0,001) e Etanol + Caf vs Etanol (+++ p < 0,001). Todos os testes foram submetidos a ANOVA one-way seguido do teste post hoc de Sidak, p < 0,05.

#### 4.4.6. O bloqueio de A<sub>2A</sub> reduz os níveis de NO, mas causa peroxidação lipídica no CPF e HIP

A **fig. 35** mostra que o bloqueio seletivo dos receptores A<sub>2A</sub> não está envolvido no aumento de espécies reativas de nitrogênio e na melhora da peroxidação lipídica nos mecanismos da cafeína em animais expostos ao etanol no CPF. Visto que houve redução

de NO (Etanol [ $167,0 \pm 12,92$ ] vs Etanol + Ant [ $120,2 \pm 2,019$ ],  $+p < 0,05$ , **fig.35A**), bem como promoveu peroxidação lipídica pois houve aumento de TBARS comparado ao controle (Controle [ $100 \pm 10,88$ ] vs Etanol + Ant [ $158,8 \pm 9,583$ ],  $* p < 0,05$ , **fig.35B**). No HIP houve efeito equivalente ao CPF em NO (Etanol [ $125,0 \pm 7,461$ ] vs Etanol + Ant [ $88,44 \pm 1,052$ ],  $+p < 0,05$ , **fig.35A**), e em TBARS (Controle [ $100 \pm 7,657$ ] vs Etanol + Ant [ $242,4 \pm 9,353$ ]. Além disso, o grupo Ant *per se* aumentou a peroxidação lipídica em ambas as áreas (CPF: Ant [ $163,2 \pm 10,55$ ] vs Controle [ $100 \pm 10,88$ ],  $** p < 0,01$ , **fig.35B**); (HIP: Ant [ $214,9 \pm 28,84$ ] vs Controle [ $100 \pm 7,657$ ],  $** p < 0,01$ , **fig.35D**)



**Figura 35:** Efeitos de SCH58261 (0,1 mg/kg/dia) um antagonista de  $A_{2A}$  após o *binge drinking* etanol (3,0 g/kg/dia; 3 dias on-4 dias off) no sistema oxidante no CPF (**A e B**) e HIP (**C e D**). (**A**) Efeitos de SCH58261 nos níveis de NO,  $n = 3-4$ ; (**B**) Efeitos de SCH58261 nos níveis de TBARS,  $n = 3-4$ ; (**C**) Efeitos de SCH58261 nos níveis de NO,  $n = 3-5$ ; (**D**) Efeitos de SCH58261 nos níveis de TBARS,  $n = 3-4$ . Os dados foram significativos comparando: (**A**) Etanol vs Controle ( $** p < 0,01$ ) e Etanol + Ant vs Etanol ( $+ p < 0,05$ ); (**B**) Etanol, Etanol + Ant vs Controle ( $* p < 0,05$ ) e Ant vs Controle ( $** p < 0,01$ ); (**C**) Etanol vs

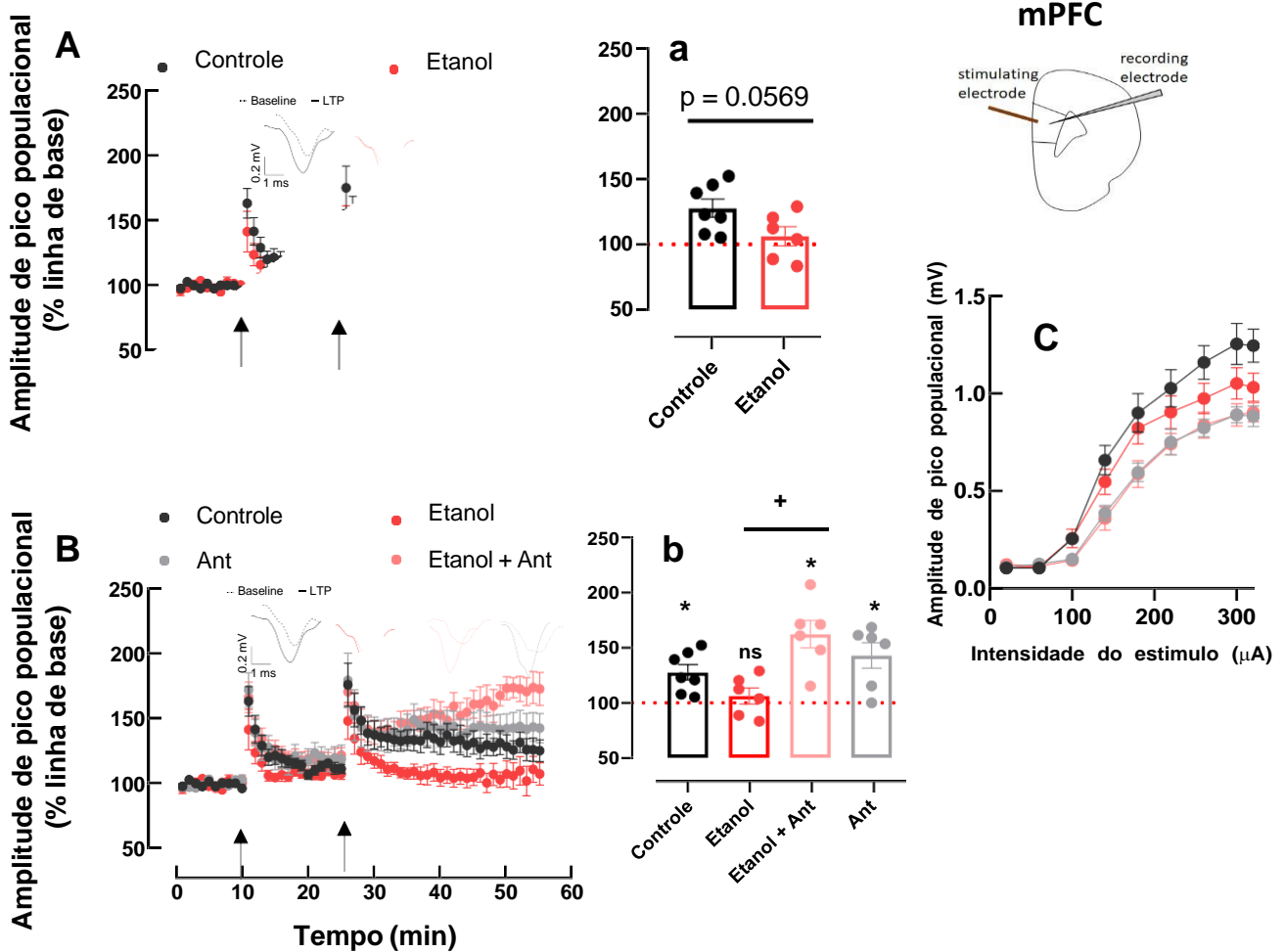
Controle (\*  $p < 0,05$ ) e Etanol + Ant vs Etanol (++)  $p < 0,01$ ); (D) Etanol e Etanol + Ant vs Controle (\*\*\*  $p < 0,001$ ) e Ant vs Controle (\*\*  $p < 0,01$ ). Todos os testes foram submetidos a ANOVA one-way seguido do teste post hoc de Sidak,  $p < 0,05$ .

#### 4.5. REGISTROS ELETROFISIOLÓGICOS EXTRACELULARES *EX-VIVO*

##### 4.5.1. *Binge drinking* etanol apresenta tendência de déficit de LTP e o bloqueio seletivo de $A_{2A}$ evita esta alteração no mPFC pré-límbico nos picos populacionais.

Os picos populacionais representam uma resposta integrada de todas as células presentes no local de estimulação, incluso as células piramidais e os interneurônios, neste trabalho registramos os picos populacionais com o intuito de se observar alterações na formação de LTP, o que pode implicar em mudanças de plasticidade na neurocircuitária destes neurônios no mPFC na camada 5 com estimulação da camada 2/3.

Inicialmente foi obtido a amplitude de pico populacional (**figura 36A,B**), através de estímulos de 0,1 ms por 15s para estabilidade de resposta, posteriormente foi obtido a curva input/output (**figura 36C**) para obtenção da linha de base e por conseguinte induzir o LTP que foi medido pela média comparativa entre 20-30 min (últimos 10 min) após 4 conjuntos de estímulos (4 x 100Hz) e do 1º estímulo inicial (linha de base-1 x100 Hz). Comparando-se grupos controle com grupo etanol foi observado uma tendência de déficit de LTP (Controle [ $127,8 \pm 6,93\%$ ] vs Etanol [ $106,3 \pm 7,28\%$ ],  $p = 0,059$ , **fig.36a,b**), por outro lado SCH58261 evitou tal déficit comparando com o grupo etanol (Etanol + Ant [ $162,4 \pm 12,4\%$ ] vs Etanol [ $106,3 \pm 7,28\%$ ], +  $p < 0,05$ ; **fig.36b**). Além disso, o Ant *per se* foi capaz de aumentar a magnitude do pico populacional de LTP ([ $162,4 \pm 11,49\%$ ], \* $p = 0,0134$ ). Estes resultados indicam que os receptores  $A_{2A}$  podem estar envolvidos na regulação da plasticidade sináptica frente ao etanol, bem como fisiologicamente com o uso de longo-prazo de SCH58261 ocorre uma melhora na plasticidade. Outros resultados foram significantes: Controle ([ $127,8 \pm 6,93\%$ ], \*  $p = 0,0071$ ), Etanol + Ant [ $143 \pm 12,41\%$ ], \*  $p = 0,0040$ ) e Ant ([ $162,4 \pm 11,49\%$ ], \* $p = 0,0134$ ) comparado à linha de base [100%].

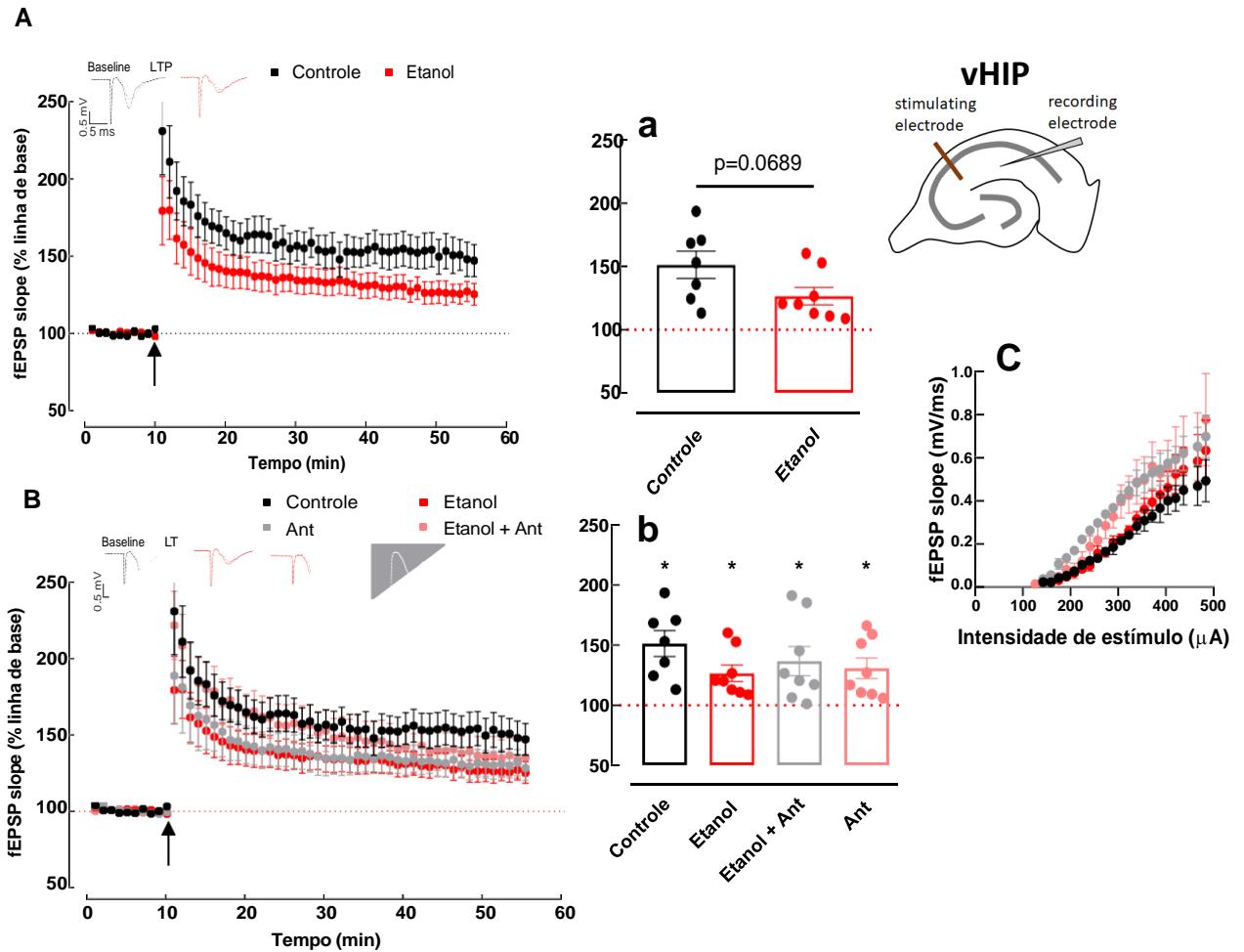


**Figura 36:** Efeitos de SCH58261 (0,1 mg/kg/dia) um antagonista de  $A_{2A}$  após o *binge* drinking etanol (3,0 g/kg/dia; 3 dias on -4 dias off) sobre a formação de LTP da adolescência à idade adulta de ratos fêmeas no mPFC pré-límbico. **(A)** e **(B)** Amplitude de pico populacional de neurônios na camada 5. **(a)** e **(b)** formação de LTP nos últimos 10min (20-30min) em **(A)** e **(B)**, a seta indica os estímulos de alta intensidade e em **(C)** a curva input/output. Os valores foram obtidos como média  $\pm$  e.p.m de  $n = 6-7$  animais por grupo. Dados apresentaram tendência de redução de LTP em animais expostos por etanol: **(a)** e **(b)** Controle vs Etanol ( $p = 0,0569$ ) e o Ant evitou tal déficit **(b)** Etanol + Ant vs Etanol ( $+ p < 0,05$ ). Outros dados foram significantes: Controle ([127,8  $\pm$  6,93%], \*  $p = 0,0071$ ), Etanol + Ant [143  $\pm$  12,41%], \*  $p = 0,0040$ ) e Ant ([162,4  $\pm$  11,49%], \*  $p = 0,0134$ ) vs linha de base [100%]. Parte dos testes foram submetidos à ANOVA one-way seguida do teste post hoc de Sidak,  $+ p < 0,05$  ao comparar-se os grupos e outra parte teste t Student para \*  $p < 0,05$  ao comparar-se com a linha de base.

#### 4.5.2. *Binge drinking* etanol apresentou uma tendência de déficit de LTP e o bloqueio seletivo de A<sub>2A</sub> atenua esta alteração em vHIP.

Ao se investigar o LTP na porção vHIP nas células piramidais no *stratum radiatum* da área CA1 foi registrado os potenciais excitatórios pós-sinápticos na fase ascendente (fEPSP slope) de um único estímulo na frequência de 100Hz para indução de LTP. Observou-se que o grupo controle comparado ao etanol apresentou tendência de déficit de LTP nesta região por redução de amplitude de LTP (Controle [151,28 ± 10,77%] vs Etanol [126,60 ± 6,877%],  $p = 0,0689$  **fig.37 A,a**). Percebeu-se que o uso do antagonista contra o paradigma do etanol apresentou tendência de aumento de LTP (Etanol + Ant [136,70 ± 12,1%], \*  $p = 0,0196$ , **fig.37b**), e o Ant sozinho ([130,78 ± 8,62%], \* $p = 0,0091$ ) apresentou uma tendência de redução de LTP comparado a linha de base. Outros dados foram significantes: Controle ([151,28 ± 10,77%], \*  $p = 0,0031$ ), Etanol ([126,60 ± 6,87%], \*  $p = 0,0061$ ), Etanol + Ant [136,70 ± 12,1%], \*  $p = 0,0196$ ) e Ant ([130,78 ± 8,62%], \* $p = 0,0091$ ) vs linha de base [100%]. Parte dos testes foram submetidos à ANOVA one-way seguida do teste post hoc Sidak,  $p > 0,05$  ao comparar-se os grupos e outra parte teste t Student para \*  $p < 0,05$  ao comparar-se com a linha de base. Estes resultados indicam que o vHIP também é vulnerável ao etanol, e que bloqueio de A<sub>2A</sub> está envolvido nestes mecanismos, porém tal efeito não se refletiu ao utilizar apenas o antagonista que reduziu LTP.

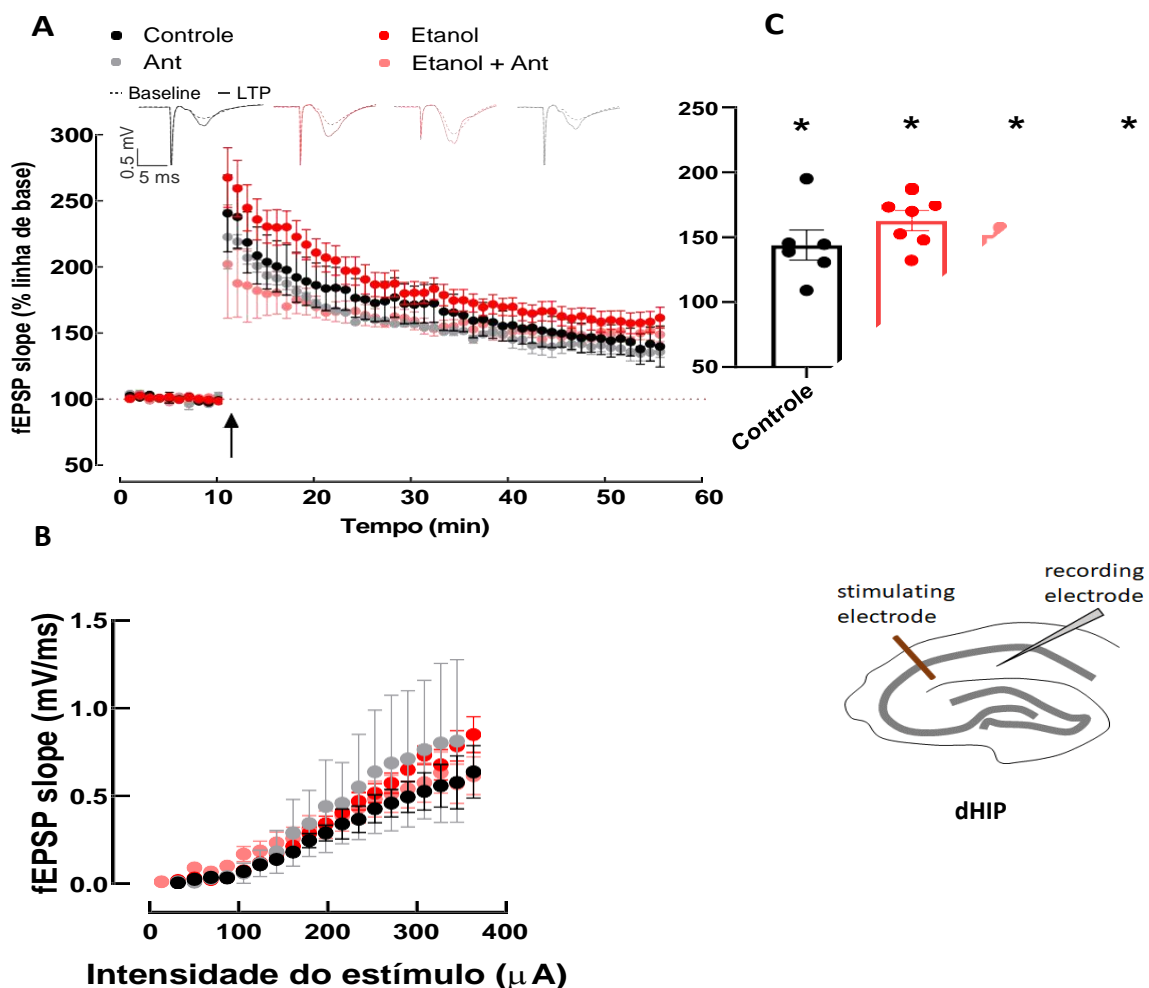




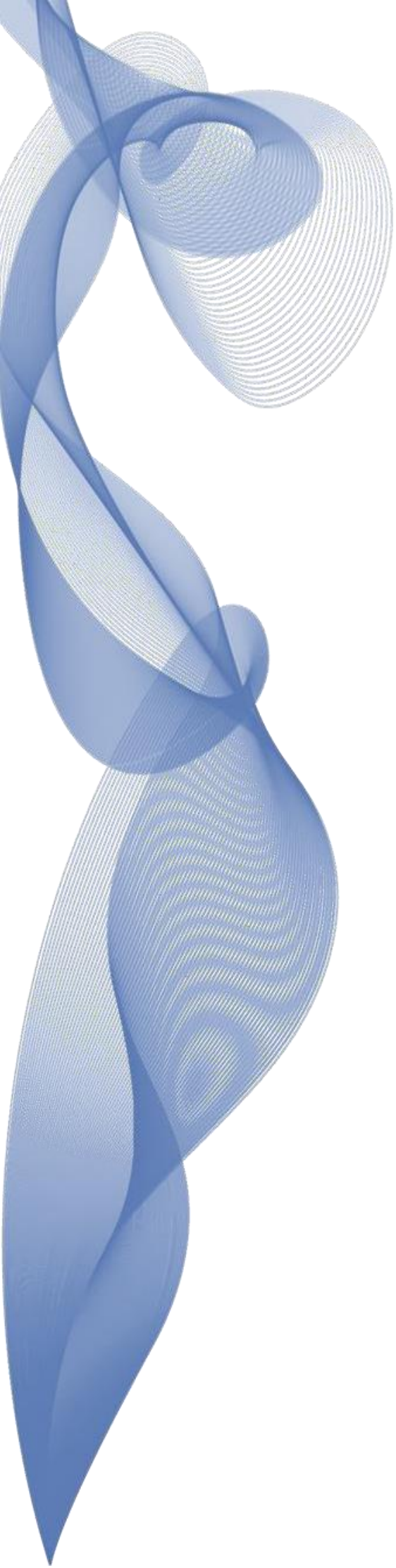
**Figura 37:** Efeitos de SCH58261 (0,1 mg/kg/dia) um antagonista de  $A_{2A}$  após o *binge drinking* etanol (3,0 g/kg/dia; 3 dias on -4 dias off) sobre a formação de LTP da adolescência à idade adulta de ratos fêmeas na porção ventral do HIP. **(A)** e **(B)** Amplitude de neurônios piramidais na *stratum radiatum* do vHIP medido ESPS (slope). **(a)** e **(b)** formação de LTP nos últimos 10min (35-45min) e em **(A)** e **(B)** as setas indicam o estímulo de alta intensidade (1 x 100HZ) e em **(C)** a curva input/output. Os valores foram obtidos como média  $\pm$  e.p.m de  $n = 7-8$  animais por grupo. Dados apresentaram tendência de déficit de LTP em animais expostos por etanol: **(a)** Controle vs Etanol ( $p = 0,0689$ ). Na comparação entre os outros grupos não houve diferença estatística. Além disso, outros dados foram significantes: Controle ( $[151,28 \pm 10,77\%]$ , \*  $p = 0,0031$ ), Etanol ( $[126,60 \pm 6,87\%]$ , \*  $p = 0,0061$ ), Etanol + Ant ( $[136,70 \pm 12,1\%]$ , \*  $p = 0,0196$ ) e Ant ( $[130,78 \pm 8,62\%]$ , \*  $p = 0,0091$ ) vs linha de base [100%]. Parte dos testes foram submetidos à ANOVA one-way seguida do teste post hoc de Sidak,  $p > 0,05$  e outra parte teste t Student para \*  $p < 0,05$  ao comparar-se com a linha de base.

#### 4.5.3. Binge drinking ethanol não induziu déficit de LTP e o bloqueio seletivo de A<sub>2A</sub> não está envolvido nesta alteração no dHIP.

Ao se investigar o LTP na porção dHIP nas células piramidais no *stratum radiatum* da área CA1 foi registrado os potenciais excitatórios pós-sinápticos na fase ascendente (fEPSP slope) de um único estímulo na frequência de 100Hz para indução de LTP. Observou-se que houve aumento na magnitude no fEPSP do grupo Etanol aumentando LTP ( $[159,36 \pm 7,38 \%$ ], \*  $p = 0,0015$ ), por outro lado houve uma redução de magnitude do grupo Etanol + Ant ( $[149,21 \pm 3,7\%$ ], \*  $p = 0,0008$ ) com tendência de redução de LTP frente ao paradigma do etanol e Ant ( $[138,16 \pm 5,25 \%$ ], \* $p = 0,0013$ ) também apresentou a mesma tendência. Parte dos testes foram submetidos à ANOVA one-way seguida do teste post hoc Sidak,  $p > 0,05$  ao comparar-se os grupos e outra parte teste t Student para \*  $p < 0,05$  ao comparar-se com a linha de base [100%]. Estes resultados indicam que a região que dHIP aumenta LTP e que o uso do bloqueador A<sub>2A</sub> de longo prazo frente ao etanol reduz LTP, bem como o Antagonista. **Ver figura 38**



**Figura 38:** Efeitos de SCH58261 (0,1 mg/kg/dia) um antagonista de  $A_{2A}$  após o *binge drinking* etanol (3,0 g/kg/dia; 3 dias on -4 dias off) sobre a formação de LTP da adolescência à idade adulta de ratos fêmeas na porção dHIP. **(A)** e **(B)** Amplitude de neurônios piramidais na *stratum radiatum* do dHIP medido por fESPS slope. **(a)** e **(b)** formação de LTP nos últimos 10min (35-45min) e em **(A)** e **(B)**, as setas indicam o estímulo de alta intensidade e em **(C)** a curva input/output. Os valores foram obtidos como média  $\pm$  e.p.m de n = 4-7 animais por grupo. Dados apresentados mostraram aumento de LTP por etanol e redução de LTP pelo SCH58261 quando presentes nos grupos. dados foram significantes: Controle ([143,98  $\pm$  11,6%], \* p = 0,0048), Etanol ([159,36  $\pm$  7,38 %], \* p = 0,0015), Etanol + Ant [ 149,21  $\pm$  3,7%], \* p = 0,0008 ) e Ant ([ 138,16  $\pm$  5,25 %], \*p = 0,0013 ) vs linha de base [100%]. Teste t Student para \* p < 0,05 ao comparar-se com a linha de base.



---

---

V. DISCUSSÃO

---

---

## 5. DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou pela primeira vez que a ingestão de cafeína em longo prazo e em baixas doses recupera as alterações neurocomportamentais e danos oxidativos induzidos pelo consumo em padrão *binge* de etanol da adolescência à idade adulta em ratos fêmeas. Nossos resultados também sugerem a participação da sinalização dos receptores  $A_{2A}$  para evitar, parcialmente ou de forma efetiva, as alterações relacionadas à atividade locomotora espontânea, comportamento do tipo ansioso e memória de curto prazo após a retirada imediata do etanol. Assim, postulamos que a cafeína evitou alterações comportamentais através de mecanismos de equilíbrio redox no CPF e HIP quando comparado ao antagonista seletivo  $A_{2A}$ . Além disso, demonstramos que o antagonismo seletivo de  $A_{2A}$  de longo-prazo confere uma estratégia interessante frente ao paradigma de etanol por mecanismos que envolvem a formação de LTP, principalmente no CPF.

Nos ensaios comportamentais, no paradigma do campo aberto, os resultados demonstram que a exposição de ratos fêmeas adolescentes ao modelo *binge* de etanol causa alterações na locomoção espontânea, que consiste em uma deambulação do componente exploração *versus* tigmotaxia, característico de roedores. Esta modificação já havia sido observada anteriormente pelo nosso grupo, com evidências de alterações no córtex motor e cerebelo (FERNANDES et al., 2018a; OLIVEIRA et al., 2015). Estudos indicam que o desempenho motor pode ser afetado pelo etanol em altas doses, induzindo um aumento de ADO, acetato e Ach em todas as regiões do cérebro, incluindo áreas motoras, através de mecanismos diretos (isto é, inibição de ENT-1), bem como atividades indiretas, ou seja, metabolismo do etanol (KISELEVSKI et al., 2003; PARDO et al., 2013).

Esse aumento de ADO pode provocar hiperexcitabilidade neural em diversas regiões do cérebro, neurocircuitos e alteração do equilíbrio na relação dos receptores  $A_1/A_{2A}$ , visto que neuroadaptações nos receptores adenosinérgicos ocorrem e são dependentes do tempo de exposição ao etanol, do processo de retirada, a espécie, modelo e o protocolo de administração (BUTLER; PRENDERGAST, 2012). Consequentemente, a ADO pode contribuir para os efeitos do etanol, não só do ponto de vista puramente motor como evidenciado em estudos de supressão ou incoordenação motora, por aumento na estimulação do corpo estriado e cerebelo (DAR; MUSTAFA; WOOLLES, 1993;

MENG; DAR, 1995; MORI, 2020). ), bem como pode interferir nos neurocircuitos gerais motivacionais dependentes do CPF e via mesocorticolímbica (BLAZQUEZ et al., 2002).

Neste contexto, a nossa hipótese é que o bloqueio dos receptores adenosinérgicos podem reduzir o aumento da estimulação de regiões cerebrais, contribuindo para a melhora dos distúrbios neurocognitivos e motivacionais induzidos pelo *binge* drinking na adolescência. De acordo com nossos resultados, a cafeína induziu aumento da atividade locomotora espontânea, melhorando o comportamento de exploração da arena, sugerindo motivação motora após exposição ao etanol. Tradicionalmente, a cafeína apresenta um efeito bifásico, no qual em doses mais baixas ocorre estimulação motora e em doses mais altas há supressão motora em roedores (DAR, 1988), no entanto, na presença de etanol, podem ocorrer efeitos duais.

WALDECK (1974) avaliou a interação da cafeína mais etanol em camundongos fêmeas e descobriu que baixas doses de cafeína associada ao etanol podem potencializar a estimulação motora, enquanto o aumento progressivo de cafeína e etanol (3 – 4 g/kg) reduziu a estimulação motora até abolição de tal efeito (Caf 100 mg/kg). Além disso, foi observado um aumento acentuado de catecolaminas (DA e NA), que podem contribuir para os aspectos motivacionais motores observados. Neste estudo, o comportamento motor foi modificado pela dose, horário e via de administração dessas drogas. Ressalta-se que o paradigma deste estudo se baseia nas alterações observadas no período imediato de abstinência, logo não tem como objeto de estudo os efeitos comportamentais durante o período de biodisponibilidade alcoólica.

Em nosso protocolo validado, o consumo excessivo de etanol durante a adolescência reduz a deambulação espontânea de ratos (FERNANDES et al., 2018a; BELÉM-FILHO et al., 2018; OLIVEIRA et al., 2018). O presente estudo demonstra que a cafeína minimiza os efeitos da abstinência do etanol, melhorando o desempenho motivacional motor pelo bloqueio não seletivo dos receptores  $A_1$  e  $A_{2A}$ . CUNHA (2005) observou que sob condições nocivas e estímulo crônico, ocorre a modificação do equilíbrio dos receptores adenosinérgico, com regulação negativa (*downregulation*) de  $A_1$  e regulação positiva (*upregulation*) de receptores  $A_{2A}$ . De fato, durante o estresse celular, ou seja, a retirada do etanol, a ADO está associada aos danos excitotóxicos ocasionados pelo aumento dos níveis de GLUT extracelular, bem como à interação com receptores de DA que podem contribuir com as deficiências motoras e motivacionais observadas.

Em nosso estudo, avaliamos o papel dos receptores  $A_{2A}$  nos efeitos positivos motores da cafeína. Os receptores  $A_{2A}$  sofrem regulação positiva de acordo com o envelhecimento e condições nocivas, sendo que uma superexpressão de receptores  $A_{2A}$  no HIP, córtex e corpo estriado afeta a locomoção de ratos (COELHO, 2014; RIBEIRO; SEBASTIÃO; DE MENDONÇA, 2002). Para investigar essa teoria, realizamos o bloqueio seletivo farmacológico dos receptores  $A_{2A}$  no protocolo de *binge drinking*. Nossos resultados induziram aumento da atividade locomotora espontânea, indicando que os receptores  $A_{2A}$  podem participar da recuperação motora espontânea. Além disso, demonstramos que o antagonismo da sinalização  $A_{2A}$  *per se* induz estimulação motora espontânea, o que reflete o efeito modulatório do circuito gânglio-tálamo-cortical, mesocorticolímbico e a interação  $A_{2A}/D_2$ , que também pode cooperar para tal mecanismo (MORI, 2020).

Resultados contraditórios foram encontrados por CONNOLE; HARKIN; MAGINN, (2004), que relataram que o receptor  $A_1$  consiste no principal receptor envolvido nas alterações motoras após a exposição ao etanol, visto que o bloqueio seletivo dos receptores  $A_1$  atenuou as alterações observadas após exposição ao etanol (2,5g/kg), que não foi encontrado no bloqueio do receptor  $A_{2A}$ . Esses dados contraditórios podem ser explicados pela função motora avaliada, que no estudo de CONNOLE; HARKIN; MAGINN foi analisada a coordenação motora dependente do cerebelo, corpo estriado e córtex motor, enquanto a atividade motora espontânea depende de áreas motivacionais, como o CPF (BUCHSBAUM, 2004; TEKIM; CUMMINGS, 2002).

Em outras palavras, os receptores de ADO sofrem neuroadaptação variável segundo as condições experimentais e estímulos cerebrais, entretanto novos estudos devem ser realizados para elucidar o envolvimento dos receptores  $A_1$  na função motora.

No presente trabalho, baixa dose de longo-prazo de cafeína estimulou a atividade locomotora após exposição ao etanol em ratos adolescentes, mediada por receptores  $A_{2A}$ .

Na avaliação do comportamento do tipo ansiedade, os resultados obtidos nos testes de campo aberto e labirinto em cruz elevado indicaram comportamento do tipo ansiedade após o protocolo de *binge drinking* durante a adolescência em ratos fêmeas. Este resultado semelhante foi encontrado anteriormente por nosso grupo e outras investigações em roedores fêmeas e machos (FERNANDES et al., 2018b; COLEMAN et al., 2014; VETRENO et al., 2014; MONTESINOS et al., 2016). Esses dados sugerem que o comportamento do tipo ansiedade é um perfil característico de exposição de curto ou

longo prazo do modelo de *binge drinking* durante a adolescência em animais e humanos (CREWS et al., 2016; PELTIER et al., 2019).

Alguns estudos que mimetizam a ressaca (hangover) crônica, subcrônica e abstinência após a ingestão de etanol indicam que o comportamento de ansiedade é devido ao aumento da via de sinalização dos receptores  $A_1$  (DALY et al., 1994, PREDIGER; BATISTA; TAKAHASHI, 2004; SOARES et al., 2009; DAR; MUSTAFA; WOOLLES, 1983), e portanto, pode potencializar a hiperexcitabilidade neuronal durante o comportamento do tipo ansioso sem alterações nos receptores  $A_{2A}$  em áreas corticais, tais como o córtex frontal, cerebelo e estriado (KAPLAN et al., 1999).

Neste estudo, os animais tratados com cafeína após o protocolo de *binge drinking* reverteram o comportamento de ansiedade, demonstrando que o bloqueio não seletivo consiste em uma estratégia robusta para minimizar as condições de ansiedade desenvolvidas pela exposição ao etanol. Contraditoriamente, o uso concomitante dessas duas drogas induz à níveis mais elevados de comportamento ansioso em adolescentes e roedores do que em machos no modelo da caixa claro-escuro (HUGHES, 2011), enquanto doses baixas a moderadas de cafeína aguda são ansiogênicas, reduzindo o efeito do tipo ansiolítico do etanol em baixas doses (1,0 – 1,4 g/kg) (GULICK; GOULD, 2009). Tal efeito contraditório observado reflete o efeito agudo do álcool e cafeína, diferentemente deste trabalho que avalia a retirada imediata.

Tradicionalmente, antagonistas não seletivos de receptores de ADO, tais como a cafeína, produzem efeitos do tipo ansiedade em doses moderadas a altas (15, 30 e 60 mg/kg) em vários modelos animais de avaliação do tipo de ansiedade, tais como LCE, caixa escura/clara, interação social e testes de conflito de Vogel (IMAZUMI et al., 1996; KULKARNI; SINGH; BISHNOI, 2007; YACOUBI et al., 2000). No entanto, KULKARNI; SINGH; BISHNOI, (2007) postularam que baixas doses de cafeína (8 mg/kg) não provocaram efeito ansiogênico e sugerem que seus efeitos parecem estar relacionados à dose, como em humanos.

Na verdade, nossos dados mostraram que a administração crônica de cafeína em doses de 10mg/kg/dia durante a adolescência promoveu comportamento ansiolítico. Uma vez que a administração de cafeína em longo prazo promove um aumento na expressão de receptores  $A_1$ , conforme FREDHOLM et al. (1999) e este possui papel inibitório. Bem como, os efeitos da cafeína em longo prazo podem ser mais benéficos do que maléficis, qualitativa e quantitativamente, diferentemente das doses agudas de cafeína (FREDHOLM, 1995). Sugerimos, que os resultados obtidos indicam que a baixa dose de



caféina crônica em estudos de ansiedade mostra mecanismos de neuroproteção mediado pelos receptores  $A_{2A}$  e  $A_1$ , evitando a hiperexcitabilidade induzida por ADO provocada pela exposição ao etanol, bem como modulando neuroadaptações, principalmente nos receptores  $A_1$ .

A primeira proposição é apoiada por nossos resultados na avaliação dos efeitos dos receptores  $A_{2A}$ , em que ratos tratados com antagonista  $A_{2A}$  atenuaram o comportamento de ansiedade causado pela exposição ao etanol, enquanto tal efeito não foi observado na administração do Ant *per se*, indicando o envolvimento dos receptores  $A_{2A}$  na normalização da hiperexcitabilidade, amenizando o efeito comportamental da ansiedade. Em consonância com isso, a superexpressão de receptores  $A_{2A}$  no HIP, córtex e corpo estriado pode estar envolvida no perfil de ansiedade de ratos (COELHO, 2014).

A segunda proposição não foi avaliada, mas evidências sugerem que o agonismo seletivo dos receptores  $A_1$  produz efeitos ansiolíticos no teste do LCE (FLORIO et al., 1998; JAIN et al., 1995; PREDIGER; BATISTA; TAKAHASHI, 2004), no qual a coadministração de agonistas do receptor  $A_1$  associado ao etanol resulta em resposta ansiolítica (PREDIGER; BATISTA; TAKAHASHI, 2004). Tais achados apoiam nossos resultados, indicando que a baixa dose de caféina crônica reduz o comportamento de ansiedade após a exposição ao etanol mediada pelo receptor  $A_{2A}$ , mas não exclui o envolvimento do receptor  $A_1$ .

Na avaliação cognitiva, a memória de curto prazo foi investigada pelo teste de reconhecimento de objeto, que é mais sensível na ocorrência de lesão hipocampal e cortical, uma vez que essas estruturas cerebrais são importantes para o reconhecimento visual de objetos em roedores (BUCKMASTER et al., 2004; CLARK; ZOLA; SQUIRE, 2000). Na verdade, a formação da memória durante a tarefa é mediada por regiões parahipocampais através de áreas do lobo temporal (ou seja, córtices perirrinal, entorrinal e temporal inferior) (HAMMOND et al., 2004). De acordo com nossos resultados, a exposição ao etanol da adolescência à idade adulta em ratos fêmeas prejudicou a memória de curto prazo. Nosso grupo de pesquisa já demonstrou danos na memória após 1, 4 e 5 ciclos do modelo de *binge drinking* desde o início da adolescência até a vida adulta (FERNANDES et al., 2018b; NASCIMENTO et al., 2020; OLIVEIRA et al., 2015).

O etanol afeta a maturação do CPF e do HIP durante o neurodesenvolvimento, prejudicando a neuroplasticidade e, conseqüentemente, a memória, uma vez que o HIP apresenta interações com diversas estruturas corticais (CREWS; NIXON, 2009; LESTING et al., 2011). Essas alterações envolvem mecanismos de excitotoxicidade

mediados por receptores NMDA e, conseqüentemente, inibição da LTP (WHITE; MATTHEWS; BEST, 2000). De fato, os sistemas purinérgicos também podem contribuir para o comprometimento da memória induzido pelo etanol. Um desequilíbrio dos receptores  $A_1/A_{2A}$  pode gerar disfunção da memória pela exposição ao etanol.

Evidências sugerem que o etanol aumenta os níveis de ADO em CA1 de secções hipocâmpais de ratos quando utilizados inibidores da captação de ADO, como dipiridamol e S-(4-nitrobenzil)-6-tioinosina, induzindo respostas excitatórias (DIAO; DUNWIDDIE, 1996; DUNWIDDIE; DIAO, 1994). Além disso, o acetato pode aumentar a liberação de ADO pela inibição do transportador bi-direcional (FREDHOLM; WALLMAN-JOHANSSON, 1996).

Os resultados obtidos no teste de reconhecimento de objeto indicam que a cafeína reverte o comprometimento da memória de curto prazo após a exposição ao etanol, demonstrando proteção cognitiva. Estudos postularam que baixas doses de cafeína revertem o comprometimento da memória pela exposição ao etanol na memória de reconhecimento (SPINETTA et al., 2008) e testes de labirinto aquático de Morris (DASH et al., 2004).

Apesar da cafeína promover o bloqueio não seletivo dos receptores de ADO, o antagonismo dos receptores  $A_{2A}$  pode ser fundamental para o aprimoramento da memória, pois regula a função sináptica (CUNHA et al., 2008; REBOLA et al., 2008). Além disso, os receptores  $A_{2A}$  extra-estriatais estão envolvidos no controle da liberação ou interação com neurotransmissores importantes para o processo cognitivo, tais como o GLUT (via NMDA) e Ach (receptores nicotínicos) no HIP (REBOLA; OLIVEIRA; CUNHA, 2002; REBOLA et al., 2008), assim como as catecolaminas (SPERLAGH; VIZI, 2011).

Nossos resultados demonstraram que os animais tratados com cafeína *per se* aumentaram o tempo de investigação e o índice de discriminação, em um efeito dependente da idade, melhorando a maturação do HIP na aprendizagem e memória e recuperando o tônus dos receptores de ADO (ARDAIS et al. 2014). Além do mecanismo neuroplástico proposto, avaliamos a contribuição dos receptores  $A_{2A}$  na atividade mnemônica mediada pela cafeína. Nossos dados mostraram que o bloqueio da via  $A_{2A}$  melhorou a memória de curto prazo, indicando uma proteção importante que pode estar envolvida na regulação do GLUT.

Vale ressaltar que a inibição dos receptores  $A_{2A}$  *per se* foi capaz de melhorar a memória de curto prazo, indicando que tal antagonismo é suficiente para desencadear a formação de memória no neurodesenvolvimento. Resultados opostos foram encontrados

por outros estudos, que relatam que a ativação de A<sub>2A</sub> provoca a facilitação da transmissão sináptica nos circuitos corticais e no HIP (MARTIN; GRIMWOOD; MORRIS, 2000; REBOLA et al., 2003; REBOLA et al., 2008). Tais resultados divergentes podem ocorrer por mecanismos compensatórios entre os receptores de ADO em nosso protocolo tipo *binge*, onde outras vias possivelmente estão envolvidas.

Alterações comportamentais na função motora, ansiedade e memória têm sido associadas ao equilíbrio redox. A ingestão e os efeitos da abstinência de etanol a longo prazo podem provocar alterações fisiológicas e celulares pela via glutamatérgica, com redução da expressão do receptor GABA<sub>A</sub> e aumento da expressão dos receptores NMDA, resultando em excitotoxicidade cerebral, e consequentemente ativação microglial, com mecanismos neuroinflamatórios e formação de ROS, induzindo estresse oxidativo (BLAINE et al, 2016; COLLINS; NEAFSEY, 2011). Além disso, o etanol altera diretamente as membranas biológicas das células e organelas (mitocôndrias), causando a produção de EROs e diminuição de ATP (COLLINS; NEAFSEY, 2011).

Nossos resultados no CPF e HIP evidenciaram uma alteração em ambas as áreas relacionadas ao equilíbrio redox, apesar de existirem estudos que demonstram ambas serem sensíveis ao estresse oxidativo (PATKI et al., 2014; SOLANKI et al., 2015). No sistema antioxidante, os níveis de TEAC e tiol foram medidos para observar de forma integrada o balanço redox. Os animais expostos ao etanol tiveram redução dos níveis de TEAC em ambas as áreas e dos níveis de tiol no CPF. Alguns estudos indicam que essa redução é mediada por altos níveis de acetaldeído, metabólito que é removido por defesas antioxidantes não-enzimáticas e enzimáticas (AUGUSTYNIAK; WASZKIEWICZ; SKRZYDLEWSKA, 2005).

Além disso, destacamos a depleção de GSH induzida pela exposição ao etanol no CPF. Alguns autores postularam que a depleção de GSH pode ocorrer por reações com resíduo de selenocisteína da glutathione peroxidase (KINTER; ROBERTS, 1996). Essa redução em longo prazo afeta o equilíbrio oxidante-antioxidante homeostático, causando prejuízos em outros sistemas antioxidantes, como Mn-SOD, Cu/Zn-SOD e glioxalase, contribuindo para os efeitos simultâneos da toxicidade do GLUT, disfunção mitocondrial, diminuição dos níveis de ATP, desequilíbrio de cálcio e danos nas regiões do HIP, amígdala e córtices, provocando ansiedade e deficiências cognitivas (SALIM, 2016).

Em contraste, os animais expostos ao etanol tratados com cafeína aumentaram os níveis de TEAC em ambas as áreas, bem como os níveis de tiol recuperados no CPF. Esses efeitos da cafeína podem estar relacionados à sua capacidade de aumentar a síntese

de GSH pela captação de cisteína que regula o transportador de aminoácidos excitatórios (EAAT) como o GLUT, proporcionando citoproteção com diminuição de disparos glutamatérgicos somados ao acúmulo de cisteína e consequente produção de GSH durante o neurodesenvolvimento, prevenindo danos cerebrais e alterações comportamentais induzidas pela exposição ao etanol (AOYAMA et al., 2011).

Além disso, demonstramos que os receptores  $A_{2A}$  podem estar envolvidos no aumento do sistema antioxidante não enzimático relacionado à via TEAC, mas não na via tiol nos animais expostos ao etanol. Esses resultados indicam que outras vias não enzimáticas ou enzimáticas necessitam de mais investigações, e o uso de antagonistas de  $A_{2A}$  em longo prazo pode diminuir as defesas antioxidantes como GSH, efeito esse que também foi observado nos animais que foram administrados somente o antagonista dos receptores  $A_{2A}$ . Aparentemente, os mecanismos de defesa antioxidantes relacionados ao antagonista  $A_{2A}$  podem ser divergentes dos observados no tratamento com cafeína. O estresse oxidativo e o consumo de GSH na reação podem ser indicativos de estresse celular ou desencadear maior captação de neurotransmissores excitatórios, visto que o antagonismo de  $A_{2A}$  pode estar envolvido na regulação da captação de GLUT em distúrbios cerebrais (PINTOR et al., 2004).

No sistema enzimático antioxidante, a exposição ao etanol reduziu os níveis de SOD nos tecidos do CPF e HIP, e a atividade da CAT no HIP. Esses efeitos já foram demonstrados pelo nosso grupo de pesquisa em amostras de sangue (FERNANDES et al., 2018a). Além disso, estudos demonstram que o etanol reduz a atividade de diferentes isoenzimas da SOD, como SOD-1 (presente no citoplasma, microsomias e sinaptossomas) e Mn-SOD (nas mitocôndrias), o que pode resultar no acúmulo de radicais superóxido e cooperar para a produção de ERNs e peroxidação lipídica (IGHODARO; AKINLOYE, 2018; REDDY et al., 1999).

Em nossos resultados, observou-se que a atividade da CAT foi reduzida principalmente no HIP, indicando que a CAT pode mediar o metabolismo oxidativo do etanol em acetato nesta área do cérebro e, consequentemente, induzir hiperexcitabilidade mediada por ADO (BUTLER; PRENDERGAST, 2012). No entanto, essa hipótese deve ser investigada. Além disso, não podemos excluir o envolvimento dos níveis de ADO no CPF, uma vez que outras enzimas cerebrais como CYP2E1 e álcool desidrogenase participam do metabolismo oxidativo do etanol (HERNÁNDEZ; LÓPEZ-SÁNCHEZ; RENDÓN-RAMÍREZ, 2016).

Além disso, a administração de cafeína em animais expostos ao etanol aumentou os níveis de SOD nos tecidos do CPF e HIP, enquanto o incremento de CAT foi observado apenas no HIP. Nossos resultados indicaram que a cafeína pode prevenir a formação de EROs, como radicais superóxido e peróxido de hidrogênio, melhorando a primeira linha de defesa, bem como pode prevenir indiretamente a superprodução de ADO e consequente toxicidade celular. Tais efeitos positivos relacionados ao sistema enzimático antioxidante causados pela administração de cafeína melhoram a cognição, o comportamento ansioso e as alterações motoras (ABREU et al., 2011; CARAVAN et al., 2016; KHADRAWY et al., 2017).

De fato, os receptores  $A_{2A}$  estão envolvidos nos mecanismos dos efeitos antioxidantes da cafeína em animais expostos ao etanol, cuja melhora no sistema enzimático antioxidante ocorreu após o tratamento do antagonismo  $A_{2A}$ . Na verdade, a inibição da  $A_{2A}$  aumentou a SOD em ambas as áreas e a CAT no HIP, indicando mecanismos protetores contra radicais superóxido, peróxido de hidrogênio e possíveis efeitos atenuantes da hiperexcitabilidade da ADO. Estudos demonstraram que os efeitos enzimáticos positivos da CAT dependem da dose e da substância, uma vez que o antagonismo dos receptores  $A_{2A}$  (1 mg/kg e 3 mg/kg por via i.p) diminui a atividade da CAT em diferentes modelos de neurotoxicidade (BORTOLATTO et al., 2011). Além disso, neste estudo, o bloqueio da  $A_{2A}$  *per se* aumentou a atividade da SOD no CPF, conferindo uma estratégia de neuroproteção na maturação cerebral.

Na investigação do sistema oxidativo, os animais expostos ao etanol sofreram danos oxidativos em ambas as áreas, indicados por espécies reativas de nitrogênio (NO) e níveis de peroxidação lipídica (TBARS) aumentados. Sobre a produção de espécies reativas, como o NO, pode resultar em oxidação de DNA, proteínas, membranas biológicas, danos inflamatórios (HALLIWELL; ZHAO; WHITEMAN, 1999), colaborando para desencadear reações de ácidos poliinsaturados, induzindo peroxidação lipídica, formação de alcanos, aldeídos, MDA (usado como biomarcador de dano) e, conseqüentemente, dano de membrana (LIU et al., 2014).

Curiosamente, ratos expostos ao etanol tratados com cafeína reduziram a peroxidação lipídica em ambas as áreas, embora a administração de cafeína tenha aumentado os níveis de NO no CPF, mas não no HIP. Esses resultados indicam que mesmo o aumento dos níveis de NO no CPF não gerou efeitos prejudiciais, uma vez que não foi observada peroxidação lipídica no CPF. De fato, a cafeína pode exercer efeito inibitório sobre a atividade da arginase no cérebro e, conseqüentemente, fornecer arginina

adicional a outras vias metabólicas para alta produção de NO, GLUT, prolina e poliaminas, que podem ser benéficas para a função cerebral através da produção de aminoácidos e regulação das sinapses (NIKOLIC; BJELAKOVIC; STOJANOVIC, 2003), hipótese esta que pode ser reforçada pelo fato da cafeína *per se* aumentar os níveis de NO. Por outro lado, a redução dos níveis de NO no cérebro de ratos idosos pode prevenir prejuízos na memória, como ocorre no HIP (LEITE et al, 2011). Além disso, podemos destacar o papel citoprotetor da cafeína em ambas as áreas, mitigando a peroxidação lipídica, a qual cafeína pode inibir o radical hidroxila, impedindo o início da peroxidação lipídica (DEVASAGAYAM et al., 1996).

Curiosamente, notamos que os receptores  $A_{2A}$  estão envolvidos em mecanismos de redução dos níveis de NO no HIP, mas não no aumento dos níveis de NO no CPF e nem na redução dos níveis de peroxidação lipídica em ambas as áreas induzidas pela administração de cafeína em animais expostos ao etanol. Considerando que ratos tratados com o antagonista de  $A_{2A}$  não conseguiram diminuir os níveis de TBARS induzidos por etanol no CPF e HIP, sugerimos que o efeito neuroprotetor da via  $A_{2A}$  identificado no comportamento pode ser desencadeado por diversos outros mecanismos, como a modulação da neurotoxicidade dependente de NMDA e neuroinflamatória (ROBLEDO; URSU; MAHY, 1999; SCHUBERT; RUDOLPHI, 1998).

Ao perceber que o bloqueio seletivo dos receptores  $A_{2A}$  pela via do estresse oxidativo não foi suficiente para explicar as melhoras comportamentais, diferentemente do que ocorreu com a cafeína, decidimos neste estudo investigar o perfil eletrofisiológico para melhor compreensão e entendimento desta via de sinalização por meio de mensuração de LTP no CPF, vHIP e dHIP com o uso em longo-prazo de SCH58261 no paradigma de *binge drinking* de etanol.

Os primeiros registros obtidos foram mensurados no mPFC na camada V de neurônios de picos populacionais, no qual se observou que 24h após o *binge drinking*, ocorreu uma tendência de déficit de LTP comparando-se ao controle. Tal alteração pode estar relacionado aos mecanismos de neurotoxicidade via estresse oxidativo e de alteração na neurotransmissão glutamatérgica em circuitos pré-límbicos que estão envolvidos no desenvolvimento da adição de forma semelhante aos psicoestimulantes e na dependência alcoólica e que afetam mPFC (KALIVAS, 2004).

É conhecido que os receptores NMDA podem ser regulados pelo etanol mediante a excitabilidade de GLUT nestes receptores iônicos, no qual alguns estudos mostram que esta regulação pode variar dependendo do tempo de administração. No caso de

administrações agudas ocorre inibição da atividade de NMDA em concentrações semelhantes ao quadro de intoxicação (KUMARI; TICKU, 2000), enquanto que administrações crônicas aumentam a expressão da subunidade N2B (alta afinidade para GLUT) em NMDA (CARPENTER-HYLAND, 2004) por respostas adaptativas mediante a inibição prolongada deste receptor e que está envolvido em mudanças de plasticidade, memória e aprendizado (BARRIA; MALINOW, 2005; TANG et al., 1999), conseqüentemente ambas as formas podem alterar a formação de LTP.

Um estudo de LTP conduzido por KROENER et al. (2012) realizou uma exposição crônica intermitente de etanol (com dose inicial de 1,6 g/kg à 8% m/v pela via i.p) submetendo os animais adultos em câmeras de inalação por 16 horas/dia por 4 dias de administração com períodos de retirada de 8 horas seguido por 3 ciclos consecutivos, onde a concentração de vapor de etanol foi de 15-17 mg/litro de ar de etanol. Foi realizada a análise do mPFC (lâmina V), no qual encontrou-se resultados diferentes para fatias retiradas imediatamente após o último episódio de etanol e fatias retiradas após 1 semana nas correntes excitatórias pós-sinápticas por técnica de voltage-clamp em neurônios através da razão NMDA/AMPA, que para isto mensurou as subunidades relacionadas a cada receptor N1 e N2 (NMDA) e Glut1 (AMPA).

De acordo com KROENER et al. (2012), nas fatias agudas houve aumento da razão NMDA/AMPA, mediada pelo aumento da expressão de N1 e N2 (NMDA) sem alterações em Glut1(AMPA), o que pode provocar déficit de LTP e alterações de plasticidade. Por outro lado, nas fatias de 1 semana, também houve aumento na razão NMDA/AMPA sem alterações nas subunidades N e Glut, porém apresentou correntes sinápticas NMDA persistente que promoveu aumento de LTP e alterações na forma das espinhas dendríticas (formato cogumelo), levando a alterações persistente de plasticidade e conseqüente alteração na função executiva como atenção e memória.

No nosso modelo sugerimos que o aumento nos níveis de ADO pela exposição ao etanol aumenta a atividade sináptica nesta região, visto que os receptores  $A_{2A}$  estão expressos em altas taxas no mPFC (PANDOLFO et al., 2013), auxiliando nas mudanças plásticas de longo prazo nas sinapses. É possível que ocorra um desequilíbrio no balanço de  $A_1/A_{2A}$  que são capazes de regular a via glutamatérgica e a indução de LTP, onde  $A_1$  inibe a liberação de GLUT e  $A_{2A}$  facilita a liberação de GLUT (REBOLA et al., 2008).

O aumento da expressão dos receptores  $A_{2A}$  e redução na expressão dos receptores  $A_1$  proposto em nossos achados, pode ocasionar maior excitotoxicidade glutamatérgica no mPFC, no qual é possível que a constante ativação desta via leve à inibição da

atividade dos receptores NMDA (como observado por KROENER et al., 2012) ou ainda à inibição da atividade de receptores glutamatérgicos do tipo metabotrópico do grupo I (mGLUT) (CUNHA, 2005), e conseqüentemente promova déficit de LTP.

Conforme nossos resultados, o comprometimento do mPFC, pelo balanço redox (depleção de GSH e aumento de estresse oxidativo), bem como o déficit de LTP pode levar a distúrbios em praticamente todas as neurocircuitarias que regulam as alterações comportamentais mencionados neste trabalho que dependem de projeções glutamatérgicas como gânglio tálamo-cortical (motora), projeções do dHIP (memória de trabalho e flexibilidade) e vHIP (ansiedade) pelo Corno de Amon 1 (CA1) para o mPFC por vias pré-límbicas e infra límbicas envolvidas no sistema adicto, bem como afetar funções clássicas do mPFC como as funções executivas, tomada de decisão e formação de memória de trabalho (DALLEY; CARDINAL; ROBBINS, 2004).

Outros resultados obtidos nos fornecem ainda mais suporte para tal proposta, visto que ao utilizarmos um bloqueador seletivo de  $A_{2A}$  de longo-prazo (SCH58261) nesta região evitou-se o déficit de LTP neste modelo *binge drinking* na adolescência. Estes achados apontam para a hipótese de que o bloqueio da provável hiperregulação de  $A_{2A}$  é uma estratégia robusta de neuroproteção. Além disso, ao utilizar o Ant de forma isolada, houve uma tendência de aumento no LTP, que necessita de mais confirmações. Este efeito pode estar relacionado às propriedades do antagonista em regular a atividade de interneurônios de picos rápidos que ativam sinapses glutamatérgicas independentes de receptores NMDA e com o envolvimento de receptores metabotrópicos do grupo I ou possibilidade de flutuações de  $Ca^{+2}$  por canais dependentes de voltagem (HUANG; HUGANIR; KIRKWOOD, 2013; KERKHOF et al., 2018; LU et al., 2007), porém tais mecanismos necessitam ser testados. Ou seja, aparentemente é uma via dependente da estimulação de receptores metabotrópicos glutamatérgicos do grupo I.

Visando esta ideia integrativa, realizamos a verificação de LTP do HIP, considerando a porção ventral e dorsal, envolvidas na emoção e cognição. No modelo *binge drinking* foi observado na porção ventral uma tendência de redução e na porção dorsal uma tendência de aumento no LTP. Este resultado sugere que as conexões do mPFC com o vHIP podem ser mais afetadas, o que pode explicar as alterações de memória de trabalho (como a memória de curta duração formada no mPFC) e a persistência do comportamento do tipo-ansiosogênico (afetando mPFC e vHIP). Esta proposta é corroborada com o estudo de STEPHENS et al. (2005) que expôs roedores a uma dieta alcóolica (dyets, Bethlehem, Pensilvânia) como única fonte alimentar por 7-10



dias com intervalos de 3 dias (retirada), com uma ingestão diária de 13-17 g/kg atingindo concentração alcóolica no sangue de 80 a 100 mg/dL. Neste modelo, os animais adultos foram submetidos no mínimo por 2 semanas de repetidas retiradas e observou-se em células piramidais CA1, no feixe colateral de Schaffer, déficit de LTP correlacionado à ansiedade e ao condicionamento do medo.

No nosso modelo verificamos que o sistema antioxidante no HIP frente ao *binge drinking* foi mais efetivo quando comparado ao CPF, apesar de ocorrer peroxidação lipídica. Aparentemente a porção ventral é mais afetada que a dorsal por estas alterações estruturais. Tal proposta é reforçada também por modificações no tônus dos receptores A<sub>1</sub>/A<sub>2A</sub>. REIS et al. (2019) afirma que ao longo do eixo hipocampal observou em camundongos C57BL/6 que A<sub>1</sub> e A<sub>2A</sub> são mais abundantes na porção dorsal do que ventral, porém ao medir na área CA1 de células piramidais fESPS *slope* nas vias colaterais Schaffer os receptores A<sub>1</sub> foram equi-efetivos na inibição excitatória de ambas as áreas, bem como demonstrou que a ativação endógena pela ADO em receptores A<sub>1</sub> causa uma maior inibição tônica na transmissão sináptica da porção ventral do que na porção dorsal.

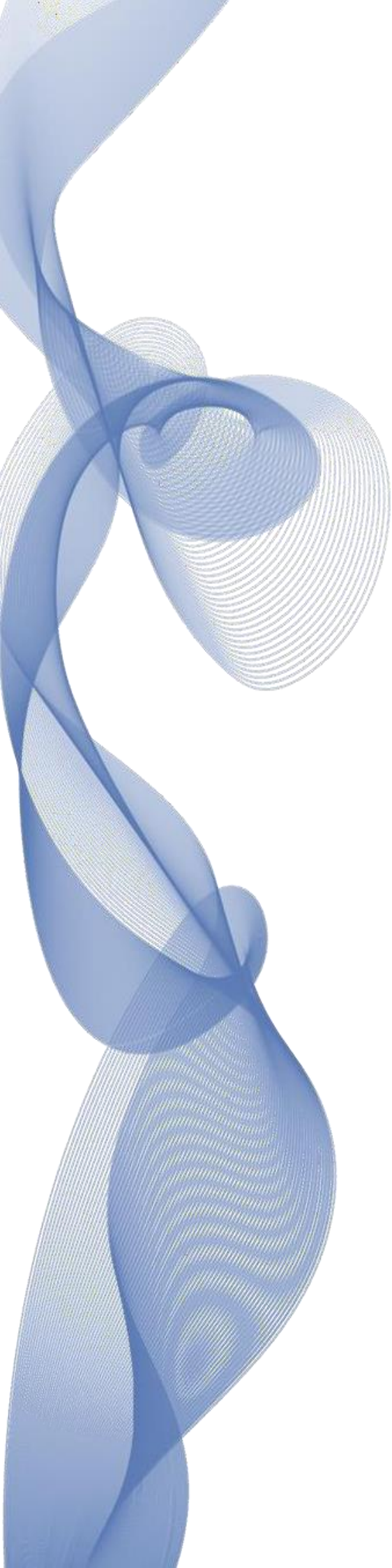
É possível que a hiperexcitabilidade endógena de ADO mediada pelo etanol promova modificações semelhantes na porção ventral, desta forma inibindo a transmissão sináptica e conseqüentemente atenuando a formação de LTP, o que reflete nossos achados com o envolvimento principal dos receptores A<sub>1</sub> e controle basal de A<sub>2A</sub> no comportamento do tipo ansiogênico. Outro fato que ressalta isto é que ao utilizar o antagonista seletivo A<sub>2A</sub> frente ao etanol ocorre uma tendência de aumento em LTP, o que corrobora com os nossos resultados comportamentais nos ensaios ansiogênicos, no qual o SCH58261 atenua o comportamento do tipo ansiogênico induzido por etanol e tal efeito pode estar envolvido por mecanismos de plasticidade e neuroadaptações (PINHEIRO, 2022). Diferentemente, o uso de longo-prazo apenas do antagonista do receptor A<sub>2A</sub>, apresenta uma tendência de redução de LTP, no qual é provável que o bloqueio por muito tempo de A<sub>2A</sub> diminui a transmissão sináptica desta via, uma vez que os receptores A<sub>2A</sub> apresentam baixa expressão no vHIP (REIS et al., 2019) e possa estar acontecendo aumento da atividade tônica de A1 por adaptação.

Curiosamente, na região dHIP o etanol apresentou uma tendência de aumento de LTP, visto que em modelos animais tanto a exposição aguda como crônica de etanol inibem a neurotransmissão excitatória hipocampal promovendo déficit de LTP (KROENER et al., 2012; TOKUDA; ZORUMSKI; IZUMI, 2007), e é proposto como

principal mecanismo de alterações de memória e de mecanismos adictos (WHITE; MATTHEWS; BEST, 2000; CARPENTER-HYLAND, 2004). Tais resultados podem ser compreendidos pela análise de SABETI; GRUOL (2008) em animais em estágios iniciais da adolescência, em modelo de vapor de etanol com esquema intermitente crônico com exposição diária de 14h *on* – 10h *off* por 12 à 14 dias, utilizando-se ratos juvenis/início da adolescência (28 à 36 dias pós-natal) e adolescentes tardios (45 à 50 dias pós-natal), no qual em estágios iniciais houve aumento de LTP nos dendritos de regiões hipocâmpais do CA1-CA3 e nos adolescentes tardios houve redução de LTP. De acordo com os autores, aparentemente nos estágios iniciais a força basal de indução de LTP é maior em magnitude que em estágios tardios da adolescência. Além disso, menciona que em estágios iniciais as sinapses em CA1 são independentes de NMDA (podendo ser regulados pela subunidade sigma-possui afinidade por esteróides hormonais ou outros mecanismos) e em estágios tardios são dependentes de NMDA. Confrontando com nossos resultados, nosso protocolo induziu exposição do etanol do 35º dia até o 58º dia (da adolescência até fase adulto-jovem) e aparentemente nossos resultados estão semelhantes aos estágios iniciais da adolescência por mecanismos independentes de NMDA.

Interessantemente, o que corrobora com nossos possíveis achados no mPFC nos picos populacionais de neurônios, a qual propomos que possivelmente há o envolvimento de receptores metabotrópico do grupo I ou ainda canais de  $Ca^{+2}$  dependentes de voltagem, ou seja, é possível que a formação de memória se mantenha íntegra nesta região por este motivo. Tal suposição é reforçada por TOKUDA; ZORUMSKI; IZUMI (2007) que menciona que a aquisição de memória nesta região é mediada por canais de  $Ca^{+2}$  ao testar o nifedipino, o que sugere novas perspectivas de investigação neste trabalho.

De tal forma, nestas regiões hipocâmpais ocorre uma grande concentração de heterodímeros  $A_{2A}/mGLUT_5$ , era esperado que ao bloquear os receptores  $A_{2A}$  ocorresse a estimulação da neurotransmissão glutamatérgica, porém isto não aconteceu frente aos estímulos neurotóxicos do etanol. Ao contrário, houve uma redução de LTP na exposição ao etanol, inclusive também observado com uso apenas do antagonista  $A_{2A}$ . É provável que outros mecanismos como os canais de  $Ca^{+2}$ , outros receptores do grupo I metabotrópico (mGLUT) e hormonais necessitem ser testados. Além disso, não se pode excluir o papel dos interneurônios de picos rápidos presentes no mPFC, que parecem ser elemento-chave no controle de todos estes processos, refletindo na possível melhora comportamental pelos receptores  $A_{2A}$ .



---

---

**VI. CONCLUSÃO**

---

---

## 6. CONCLUSÃO

Mediante uma triagem de ensaios comportamentais observou-se que a exposição ao etanol na forma de *binge* da adolescência a fase adulto-jovem, a partir da análise de parâmetros comportamentais promoveu redução da atividade locomotora espontânea, comportamento do tipo-ansio gênico e comprometimento da memória de curta duração. Além disso, a exposição ao etanol foi prejudicial na redução das defesas antioxidantes e aumento de estresse oxidativo de forma mais vulnerável ao CPF do que ao HIP, bem como promoveu redução de LTP no mPFC e vHIP; e aumento de LTP no dHIP, sugerindo-se maior vulnerabilidade em regiões corticais.

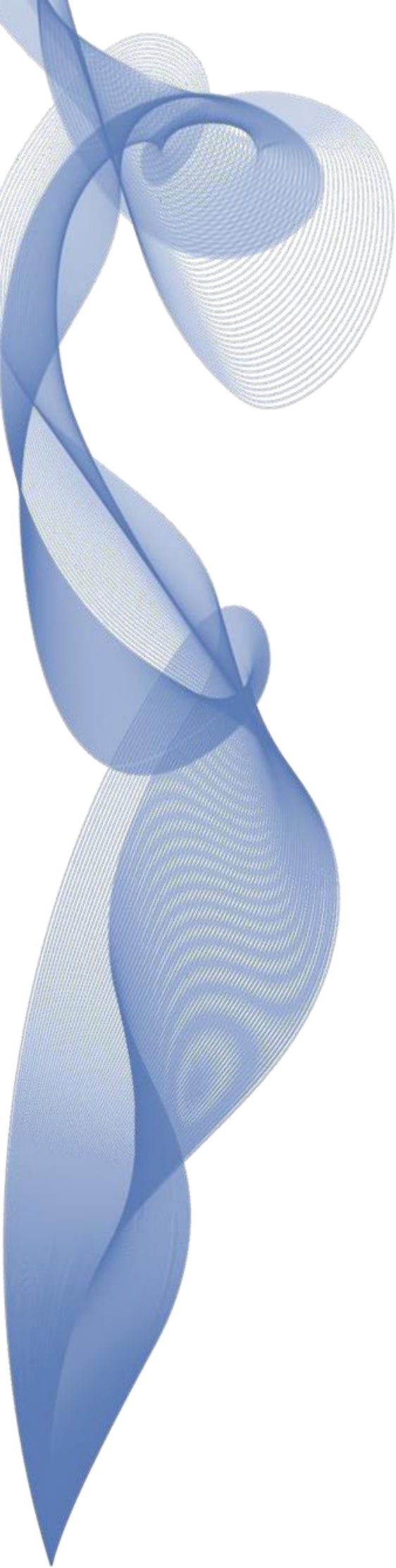
Ao se testar a Caf de longo prazo em baixas doses frente ao paradigma de etanol nos testes comportamentais demonstrou-se que houve melhora da atividade locomotora espontânea, do comportamento do tipo-ansio gênico e da memória de curta duração. Adicionalmente, nos ensaios bioquímicos do balanço redox houve uma melhora substancial das defesas antioxidantes em relação ao estresse oxidativo em ambas as áreas, o que pode estar associados às melhoras comportamentais. A Caf de longo prazo e em baixas doses *per se* apresentou melhoras comportamentais como no comportamento do tipo-ansio gênico e na memória de curta duração e no estresse oxidativo aumentou NO sem causar dano oxidativo, com aparente função basal no CPF.

O Ant *per se* administrado em longo prazo melhorou a atividade locomotora espontânea e a memória de curta duração, perante os ensaios bioquímicos melhorou algumas defesas antioxidantes enzimáticas em ambas as áreas, porém diminuiu defesas antioxidantes não enzimáticas e induziu estresse oxidativo. Na verificação de LTP aumentou no mPFC e diminuiu no vHIP e dHIP.

Ao verificar o envolvimento dos receptores  $A_{2A}$  frente ao paradigma do etanol nos mecanismos da Caf, notou-se que comportamentalmente o SCH58261 de longo prazo melhorou a função motora e memória de curta duração e em menor intensidade o comportamento do tipo-ansio gênico. Além disto, no balanço redox melhorou algumas defesas antioxidantes enzimáticas em ambas as áreas, porém diminuiu defesas antioxidantes não enzimáticas, bem como causou estresse oxidativo em ambas as áreas, desta forma não explicando as melhoras comportamentais, onde tais efeitos positivos

foram explicados pelo uso de SCH58261 de longo prazo frente ao etanol aumentado LTP no mPFC e vHIP, ajustando neurocircuitárias nestas regiões. Por outro lado, é possível que não esteja envolvido no dHIP.

Em resumo, os mecanismos antioxidantes da Caf podem estar envolvidos na melhora comportamental com participação dos receptores  $A_{2A}$  e estes receptores apresentam papel de destaque nas regiões corticais proporcionando efeitos positivos frente ao etanol que apresenta diferentes vulnerabilidades, porém mais prejudicial aos córtices. Assim compreender o balanço  $A_1/A_{2A}$  é essencial para esclarecimento dos mecanismos propostos.



---

---

**VII. REFERÊNCIAS**

---

---

## 7.REFERÊNCIAS

ABREU, E.S. et al. Alimentação mundial-uma reflexão sobre a história. **Saúde e sociedade**, v.2, n.10, p.3-14, 2001.

ABREU, R. V. et al. Chronic coffee and caffeine ingestion effects on the cognitive function and antioxidant system of rat brains. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 99, n. 4, p. 659–664, out. 2011.

AHLSTRÖM, S.; ÖSTERBERG, E. **International Perspectives on Adolescent and Young Adult Drinking**. Alcohol Res. Health n. 28, p- 258. 2004

AHMED, S. P.; BITTENCOURT-HEWITT, A.; SEBASTIAN, C. L. Neurocognitive bases of emotion regulation development in adolescence. **Developmental Cognitive Neuroscience**, v. 15, p. 11–25, out. 2015.

ALLEN INSTITUTE FOR BRAIN SCIENCE. **Allen Mouse Brain Atlas**; 2004. Disponível em: <http://mouse.brain-map.org/>. Acessado em 1º Março de 2022.

ANDERSON, W. W.; COLLINGRIDGE, G. L. The LTP Program: a data acquisition program for on-line analysis of long-term potentiation and other synaptic events. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 108, n. 1, p. 71–83, 15 jul. 2001.

AOYAMA, K. et al. Caffeine and uric acid mediate glutathione synthesis for neuroprotection. **Neuroscience**, v. 181, p. 206–215, maio 2011.

ARDAIS, A. P. et al. Caffeine triggers behavioral and neurochemical alterations in adolescent rats. **Neuroscience**, v. 270, p. 27–39, jun. 2014.

ARENDASH, G. W. et al. Caffeine protects Alzheimer's mice against cognitive impairment and reduces brain  $\beta$ -amyloid production. **Neuroscience**, v. 142, n. 4, p. 941–952, nov. 2006.

ARNAUD, M.J. Metabolism of caffeine and other components of coffee. In: Garattini, S. Ed., **Caffeine, Coffee and Health**, Raven Press, New York. 1993.

ARNAUD, M. J. Pharmacokinetics and Metabolism of Natural Methylxanthines in Animal and Man. **Methylxanthines**, n. 200, p. 33–91, 19 ago. 2010.

AUGUSTYNIAK, A.; WASZKIEWICZ, E.; SKRZYDLEWSKA, E. Preventive action of green tea from changes in the liver antioxidant abilities of different aged rats intoxicated with ethanol. **Nutrition**, v. 21, n. 9, p. 925–932, 1 set. 2005.

BAHI, A. Individual differences in elevated plus-maze exploration predicted higher ethanol consumption and preference in outbred mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 105, p. 83–88, abr. 2013.

BALTACI, S. B.; MOGULKOC, R.; BALTACI, A. K. Molecular Mechanisms of Early and late LTP. **Neurochemical Research**, v. 44, n. 2, p. 281–296, 6 dez. 2018.



BANNERMAN, D. M. et al. Regional dissociations within the hippocampus—memory and anxiety. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 28, n. 3, p. 273–283, maio 2004.

BARBOSA, K. B. F. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629–643, ago. 2010.

BARONE, J. J; ROBERTS, H.R. Caffeine consumption. **Food and Chemical Toxicology**. v. 34, nº 1, p. 119-129, 1996.

BARRON, S. et al. Adolescent Vulnerabilities to Chronic Alcohol or Nicotine Exposure: Findings From Rodent Models. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 29, n. 9, p. 1720–1725, set. 2005.

BARRIA, A.; MALINOW, R. NMDA Receptor Subunit Composition Controls Synaptic Plasticity by Regulating Binding to CaMKII. **Neuron**, v. 48, n. 2, p. 289–301, out. 2005.

BARZILAI, A.; YAMAMOTO, K.-I. DNA damage responses to oxidative stress. **DNA Repair**, v. 3, n. 8-9, p. 1109–1115, ago. 2004.

BAUDRY, M. Synaptic Plasticity and Learning and Memory: 15 Years of Progress. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 70, n. 1-2, p. 113–118, jul. 1998.

BELÉM-FILHO, I. J. A. et al. Low doses of methylmercury intoxication solely or associated to ethanol binge drinking induce psychiatric-like disorders in adolescent female rats. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 60, p. 184–194, jun. 2018.

BENARROCH, E. E. Adenosine and its receptors: Multiple modulatory functions and potential therapeutic targets for neurologic disease. **Neurology**, v. 70, n. 3, p. 231–236, 14 jan. 2008.

BERTOLA, A. et al. Mouse model of chronic and binge ethanol feeding (the NIAAA model). **Nature Protocols**, v. 8, n. 3, p. 627–637, 28 fev. 2013.

BHARADWAJ, B.; KATTIMANI, S. Clinical management of alcohol withdrawal: A systematic review. **Industrial Psychiatry Journal**, v. 22, n. 2, p. 100, 2013.

BHATTACHARYA, S. K.; SATYAN, K. S.; CHAKRABARTI, A. Anxiogenic action of caffeine: an experimental study in rats. **Journal of Psychopharmacology**, v. 11, n. 3, p. 219–224, jul. 1997.

BIBER, K. et al. Adenosine A<sub>1</sub>Receptor-Mediated Activation of Phospholipase C in Cultured Astrocytes Depends on the Level of Receptor Expression. **The Journal of Neuroscience**, v. 17, n. 13, p. 4956–4964, 1 jul. 1997.

BLAINE, S. K. et al. Alcohol Effects on Stress Pathways. **The Canadian Journal of Psychiatry**, v. 61, n. 3, p. 145–153, 9 fev. 2016.

BLAKEMORE, S.-J. Imaging brain development: The adolescent brain. **NeuroImage**, v. 61, n. 2, p. 397–406, jun. 2012.

BLAZQUEZ, P. M. et al. A network representation of response probability in the striatum. **Neuron**, v. 33, n. 6, p. 973–982, 14 mar. 2002.

BOERNGEN-LACERDA, R.; SOUZA-FORMIGONI, M. L. O. Does the increase in locomotion induced by ethanol indicate its stimulant or anxiolytic properties? **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 67, n. 2, p. 225–232, out. 2000.

BOISON, D. Adenosine kinase, epilepsy and stroke: mechanisms and therapies. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 27, n. 12, p. 652–658, dez. 2006.

BOLEWSKA, P. et al. Sequential Changes in Brain Glutamate and Adenosine A1 Receptors May Explain Severity of Adolescent Alcohol Withdrawal after Consumption of High Levels of Alcohol. **Neuroscience Journal**, v. 2019, p. 1–7, 2 jun. 2019.

BORTOLATTO, C. F. et al. Selective blockade of A2A receptor protects against neurotoxicity induced by kainic acid in young rats. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 26, n. 4, p. 495–502, 1 jun. 2011.

BOSWELL-CASTEEL, R. C.; HAYS, F. A. Equilibrative Nucleoside Transporters – A Review. **Nucleosides, nucleotides & nucleic acids**, v. 36, n. 1, p. 7–30, 2 jan. 2017.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248–254, maio 1976.

BRIONES, T. L.; WOODS, J. Chronic binge-like alcohol consumption in adolescence causes depression-like symptoms possibly mediated by the effects of BDNF on neurogenesis. **Neuroscience**, v. 254, p. 324–334, dez. 2013.

BRUCE, M.S. The Anxiogenic Effects of Caffeine. *Postgrad. Med. J.* n. 66, v.2, p.18–24, 1990.

BUCKMASTER, C. A. et al. Entorhinal Cortex Lesions Disrupt the Relational Organization of Memory in Monkeys. **Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 44, p. 9811–9825, 3 nov. 2004.

BURDAN, F. Chapter 90 - Pharmacology of Caffeine: The Main Active Compound of Coffee. In: Preedy, V. R. (Ed.). **Coffee in Health and Disease Prevention**. Academic Press. p. 823-829, 2015.

BUTLER, T. R.; PRENDERGAST, M. A. Neuroadaptations in Adenosine Receptor Signaling Following Long-Term Ethanol Exposure and Withdrawal. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 36, n. 1, p. 4–13, 18 jul. 2011.

CABALLERO, A.; GRANBERG, R.; TSENG, K. Y. Mechanisms contributing to prefrontal cortex maturation during adolescence. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 70, p. 4–12, nov. 2016.

CAETANO, R. et al. The distribution of alcohol consumption and the prevention paradox in Brazil. **Addiction**, v. 107, n. 1, p. 60–68, 7 out. 2011.

CARAVAN, I. et al. Modulatory effects of caffeine on oxidative stress and anxiety-like behavior in ovariectomized rats. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 94, n. 9, p. 961–972, set. 2016.

CARLINI, E. A. L. et. al. VI Levantamento Nacional sobre o Consumo de Drogas Psicotrópicas entre Estudantes do Ensino Fundamental e Médio das Redes Pública e Privada de Ensino nas 27 Capitais Brasileiras – 2010. São Paulo: **CEBRID - Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas**: UNIFESP - Universidade Federal de São Paulo 2010. SENAD - Secretaria Nacional de Políticas sobre Drogas, Brasília – SENAD, 2010. 503 p.

CARMICHAEL, F. J. et al. Central nervous system effects of acetate: contribution to the central effects of ethanol. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 259, n. 1, p. 403–408, 1 out. 1991.

CARPENTER-HYLAND, E. P. Chronic Ethanol Induces Synaptic But Not Extrasynaptic Targeting of NMDA Receptors. **Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 36, p. 7859–7868, 8 set. 2004.

CARRARA-NASCIMENTO, P. F. et al. Changes in extracellular levels of glutamate in the nucleus accumbens after ethanol-induced behavioral sensitization in adolescent and adult mice. **Alcohol**, v. 45, n. 5, p. 451–460, ago. 2011.

CARTA, M.; MAMELI, M.; VALENZUELA, C. F. Alcohol Enhances GABAergic Transmission to Cerebellar Granule Cells via an Increase in Golgi Cell Excitability. **Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 15, p. 3746–3751, 14 abr. 2004.

**CENTRO DE INFORMAÇÕES SOBRE SAÚDE E ÁLCOOL (CISA). Padrões de consumo de bebidas alcoólicas - Disponível em:** <<https://cisa.org.br/sua-saude/informativos/artigo/item/37-padroes-de-consumo-de-bebidas-alcoolicas>>. Acesso em: 26 jul. 2022.

CHEN, J.-F.; LEE, C.; CHERN, Y. Adenosine Receptor Neurobiology: Overview. **International Review of Neurobiology**, p. 1–49, 2014.

CHUNG, T. et al. Adolescent Binge Drinking. **Alcohol Research: Current Reviews**, v. 39, n. 1, p. 5–15, 2018.

CLARK, R. E.; ZOLA, S. M.; SQUIRE, L. R. Impaired Recognition Memory in Rats after Damage to the Hippocampus. **The Journal of Neuroscience**, v. 20, n. 23, p. 8853–8860, 1 dez. 2000.

COELHO, J. E. et al. Overexpression of Adenosine A2A Receptors in Rats: Effects on Depression, Locomotion, and Anxiety. **Frontiers in Psychiatry**, v. 5, 13 jun. 2014.

COHEN, S. J.; STACKMAN JR., R. W. Assessing rodent hippocampal involvement in the novel object recognition task. A review. **Behavioural Brain Research**, v. 285, p. 105–117, maio 2015.

COLEMAN, L. G. et al. Adolescent binge ethanol treatment alters adult brain regional volumes, cortical extracellular matrix protein and behavioral flexibility. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 116, p. 142–151, jan. 2014.

COLLINS, M. A.; NEAFSEY, E. J. Neuroinflammatory Pathways in Binge Alcohol-Induced Neuronal Degeneration: Oxidative Stress Cascade Involving Aquaporin, Brain Edema, and Phospholipase A2 Activation. **Neurotoxicity Research**, v. 21, n. 1, p. 70–78, 17 set. 2011.

CONNOLE, L.; HARKIN, A.; MAGINN, M. Adenosine A1 Receptor Blockade Mimics Caffeine's Attenuation of Ethanol-Induced Motor Incoordination. **Basic Clinical Pharmacology Toxicology**, v. 95, n. 6, p. 299–304, dez. 2004.

COSTARDI, J. V. V. et al. A review on alcohol: from the central action mechanism to chemical dependency. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 61, n. 4, p. 381–387, ago. 2015.

COURTNEY, K. E.; POLICH, J. Binge drinking in young adults: Data, definitions, and determinants. **Psychological Bulletin**, v. 135, n. 1, p. 142–156, 2009.

CREWS, F.; HE, J.; HODGE, C. Adolescent cortical development: A critical period of vulnerability for addiction. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 86, n. 2, p. 189–199, fev. 2007.

CREWS, F. T.; NIXON, K. Mechanisms of neurodegeneration and regeneration in alcoholism. **In Alcohol and Alcoholism**. n.44, v.2, p.115–127,2009.

CREWS, F. T. et al. Adolescent Alcohol Exposure Persistently Impacts Adult Neurobiology and Behavior. **Pharmacological Reviews**, v. 68, n. 4, p. 1074–1109, 27 set. 2016.

CRONE, E. A.; DAHL, R. E. Understanding adolescence as a period of social–affective engagement and goal flexibility. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 13, n. 9, p. 636–650, 20 ago. 2012.

CUI, G. et al. Concurrent activation of striatal direct and indirect pathways during action initiation. *Nature*, v. 494, n. 7436, p. 238–242, 23 jan. 2013.

CUNHA, R. A. Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in the nervous system: different roles, different sources and different receptors. **Neurochemistry International**, v. 38, n. 2, p. 107–125, fev. 2001.

CUNHA, R. A. Neuroprotection by adenosine in the brain: From A1 receptor activation to A2A receptor blockade. **Purinergic Signalling**, v. 1, n. 2, p. 111–134, 17 mar. 2005.

CUNHA, R. A. et al. Potential Therapeutic Interest of Adenosine A2A Receptors in Psychiatric Disorders. **Current Pharmaceutical Design**, v. 14, n. 15, p. 1512–1524, 2008

CUNHA, R. A. How does adenosine control neuronal dysfunction and neurodegeneration? **Journal of Neurochemistry**, v. 139, n. 6, p. 1019–1055, 16 ago. 2016.

DALLEY, J. W.; CARDINAL, R. N.; ROBBINS, T. W. Prefrontal executive and cognitive functions in rodents: neural and neurochemical substrates. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 28, n. 7, p. 771–784, jan. 2004.

DALY, J. W. et al. Chronic effects of ethanol on central adenosine function of mice. **Brain Research**, v. 650, n. 1, p. 153–156, jul. 1994.

DAR, M. S.; MUSTAFA, S. J.; WOOLLES, W. R. Possible role of adenosine in the CNS effects of ethanol. **Life Sciences**, v. 33, n. 14, p. 1363–1374, out. 1983.

DAR, M. SAEED. Functional correlation between subclasses of brain adenosine receptor affinities and ethanol-induced motor incoordination in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 37, n. 4, p. 747–753, dez. 1990.

D'ARBELOFF, T. C. et al. Microstructural integrity of a pathway connecting the prefrontal cortex and amygdala moderates the association between cognitive reappraisal and negative emotions. **Emotion**, v. 18, n. 6, p. 912–915, set. 2018.

DASH, P. K. et al. Post-Trauma Administration of Caffeine Plus Ethanol Reduces Contusion Volume and Improves Working Memory in Rats. **Journal of Neurotrauma**, v. 21, n. 11, p. 1573–1583, nov. 2004.

DAWSON, D. A.; LI, T.-K.; GRANT, B. F. A prospective study of risk drinking: At risk for what? **Drug and Alcohol Dependence**, v. 95, n. 1-2, p. 62–72, maio 2008.



DE BELLIS, M. D. Hippocampal Volume in Adolescent-Onset Alcohol Use Disorders. **American Journal of Psychiatry**, v. 157, n. 5, p. 737–744, 1 maio 2000.

DE BELLIS, M. D. et al. Prefrontal Cortex, Thalamus, and Cerebellar Volumes in Adolescents and Young Adults with Adolescent-Onset Alcohol Use Disorders and Comorbid Mental Disorders. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 29, n. 9, p. 1590–1600, set. 2005.

DE BELLIS, M. D. et al. Diffusion Tensor Measures of the Corpus Callosum in Adolescents With Adolescent Onset Alcohol Use Disorders. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 32, n. 3, p. 395–404, mar. 2008.

DE MENDONÇA, A.; SEBASTIÃO, A. M.; RIBEIRO, A. J. Inhibition of NMDA receptor-mediated currents in isolated rat hippocampal neurones by adenosine A1 receptor activation. **NeuroReport**, v. 6, n. 8, p. 1097–1100, maio 1995.

DEVASAGAYAM, T. P. A. et al. Caffeine as an antioxidant: inhibition of lipid peroxidation induced by reactive oxygen species. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1282, n. 1, p. 63–70, jun. 1996.

DIAO, L.; DUNWIDDIE, T. V. Interactions between ethanol, endogenous adenosine and adenosine uptake in hippocampal brain slices. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 278, n. 2, p. 542–546, 1 ago. 1996.

DIDONE, V. et al. Correlation between ethanol behavioral sensitization and midbrain dopamine neuron reactivity to ethanol, *Addiction Biology*, v. 21, n. 2, p. 387–396, 2014.

DIANA, M. et al. Mesolimbic dopaminergic reduction outlasts ethanol withdrawal syndrome: Evidence of protracted abstinence. **Neuroscience**, v. 71, n. 2, p. 411–415, mar. 1996.

DOUGLAS, R. J., E MARTIN, K. A. C.. Neuronal circuits of the neocortex. *Annu. Rev. Neurosci.* 27, p. 419–451. 2004. doi: 10.1146/annurev.neuro.27.070203.

144152

DRAKE, C. L. et al. Caffeine Reversal of Ethanol Effects on the Multiple Sleep Latency Test, Memory, and Psychomotor Performance. **Neuropsychopharmacology**, v. 28, n. 2, p. 371–378, 15 jul. 2002.

DUMONTHEIL, I. et al. Development of relational reasoning during adolescence. **Developmental Science**, v. 13, n. 6, p. F15–F24, 26 out. 2010.

DUNWIDDIE, T. V.; DIAO, L. Extracellular adenosine concentrations in hippocampal brain slices and the tonic inhibitory modulation of evoked excitatory responses. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 268, n. 2, p. 537–545, 1 fev. 1994.

DUNWIDDIE, T. V.; MASINO, S. A. The Role and Regulation of Adenosine in the Central Nervous System. **Annual Review of Neuroscience**, v. 24, n. 1, p. 31–55, mar. 2001.

ELLMAN, G. L. Tissue sulfhydryl groups. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 82, n. 1, p. 70–77, 1959.

ENGEL, J. A.; JERLHAG, E. Alcohol: mechanisms along the mesolimbic dopamine system. **Progress in Brain Research**, p. 201–233, 2014.

ERMINI, F. V. **Neural stem cell biology and neurogenesis in mouse models of aging and Alzheimer's disease**. 2006. Tese de Doutorado. University\_of\_Basel.

ESPINOSA, J. et al. Caffeine Consumption Prevents Memory Impairment, Neuronal Damage, and Adenosine A2A Receptors Upregulation in the Hippocampus of a Rat Model of Sporadic Dementia. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 34, n. 2, p. 509–518, 20 jun. 2013.

FANSELOW, M. S.; DONG, H.-W. Are the Dorsal and Ventral Hippocampus Functionally Distinct Structures? **Neuron**, v. 65, n. 1, p. 7–19, jan. 2010.

FEIN, G. et al. Cortical and subcortical volumes in adolescents with alcohol dependence but without substance or psychiatric comorbidities. **Psychiatry Research: Neuroimaging**, v. 214, n. 1, p. 1–8, out. 2013.

FERNANDES, D.; CARVALHO, A. L. Mechanisms of homeostatic plasticity in the excitatory synapse. **Journal of Neurochemistry**, v. 139, n. 6, p. 973–996, 1 jul. 2016.

FERNANDES, L. M. P. et al. 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**, v. 2018, p. 1–14, 19 set. 2018a.

FERNANDES, L. M. P. et al. Repeated cycles of binge-like ethanol exposure induce immediate and delayed neurobehavioral changes and hippocampal dysfunction in adolescent female rats. **Behavioural Brain Research**, v. 350, p. 99–108, set. 2018b.

FERRE, S.; VON, E. G.; FUXE, F. NOVEL ASPECTS OF ADENOSINE-DOPAMINE INTERACTIONS. **Behavioural Pharmacology**, v. 3, n. Supplement, p. 68, abr. 1992.

FERREIRA, R. et al. Bone impairment in adolescent female rats chronically exposed to ethanol. **Indian Journal of Experimental Biology** (IJEB), v. 60, n. 04, p. 258-262, 2022.

FIRUZI, O. et al. Antioxidant Therapy: Current Status and Future Prospects. **Current Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 25, p. 3871–3888, 1 set. 2011.

FISONE, G., BORGKVIST, A.; USIELLO, A. Caffeine as a psychomotor stimulant: mechanism of action. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* 61, 857–872 (2004).

FLORIO, C. et al. Adenosine A<sub>1</sub> receptors modulate anxiety in CD1 mice. **Psychopharmacology**, v. 136, n. 4, p. 311–319, 15 abr. 1998.

FRANKS, H. M. et al. The effect of caffeine on human performance, alone and in combination with ethanol. **Psychopharmacologia**, v. 45, n. 2, p. 177–181, 1975.

FRAZÃO, D. R. et al. Ethanol binge drinking exposure affects alveolar bone quality and aggravates bone loss in experimentally-induced periodontitis. **PloS One**, v. 15, n. 7, p. e0236161, 2020.

FREDHOLM, B. B. Adenosine actions and adenosine receptors after 1 week treatment with caffeine. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 115, n. 2, p. 283–286, jun. 1982.

FREDHOLM, B. B. Adenosine, Adenosine Receptors and the Actions of Caffeine. **Pharmacology & Toxicology**, v. 76, n. 2, p. 93–101, fev. 1995.

FREDHOLM, B. B. et al. Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. **Pharmacological Reviews**, v. 51, n. 1, p. 83–133, 1 mar. 1999.

FREDHOLM, B. B. et al. Adenosine and brain function. **International Review of Neurobiology**, v. 63, p. 191–270, 2005.

FREDHOLM, B. B. et al. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXI. Nomenclature and Classification of Adenosine Receptors—An Update. **Pharmacological Reviews**, v. 63, n. 1, p. 1–34, 8 fev. 2011.

FREDHOLM, B. B.; WALLMAN-JOHANSSON, A. Effects of Ethanol and Acetate on Adenosine Production in Rat Hippocampal Slices. **Pharmacology & Toxicology**, v. 79, n. 3, p. 120–123, set. 1996.

FRIDOVICH, I. **Superoxide Dismutase**. **Encyclopedia of Biological Chemistry**. p. 352-354, 2013.

FRITZ, B. M.; COMPANION, M.; BOEHM, S. L. “Wired,” Yet Intoxicated: Modeling Binge Caffeine and Alcohol Co-Consumption in the Mouse. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 38, n. 8, p. 2269–2278, 24 jun. 2014.

FUHR, U. et al. Evaluation of caffeine as a test drug for CYP1A2, NAT2 and CYP2E1 phenotyping in man by in vivo versus in vitro correlations. **Pharmacogenetics**, v. 6, n. 2, p. 159–176, abr. 1996.

FUJISAWA, S.; BUZSÁKI, G. A 4 Hz Oscillation Adaptively Synchronizes Prefrontal, VTA, and Hippocampal Activities. **Neuron**, v. 72, n. 1, p. 153–165, out. 2011.

GARCIA, A. M. B.; CARDENAS, F. P.; MORATO, S. The effects of pentylentetrazol, chlordiazepoxide and caffeine in rats tested in the elevated plus-maze depend on the experimental illumination. **Behavioural Brain Research**, v. 217, n. 1, p. 171–177, fev. 2011.

GEBICKE-HAERTER, P. J. et al. Both adenosine A1- AND A2-receptors are required to stimulate microglial proliferation. **Neurochemistry International**, v. 29, n. 1, p. 37–42, jul. 1996.

GIEDD, J. N. The Teen Brain: Insights from Neuroimaging. **Journal of Adolescent Health**, v. 42, n. 4, p. 335–343, abr. 2008.

GLORIEUX, C.; CALDERON, P. B. Catalase, a remarkable enzyme: targeting the oldest antioxidant enzyme to find a new cancer treatment approach. **Biological chemistry**, v. 398, n. 10, p. 1095–1108, 2017.

GREEN, L. C. et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. **Analytical biochemistry**, v. 126, p. 131–138, 1982.

GODDINGS, A.-L. et al. Longitudinal MRI to assess effect of puberty on subcortical brain development: an observational study. **The Lancet**, v. 383, p. S52, fev. 2014.

GOMES, C. V. et al. Adenosine receptors and brain diseases: Neuroprotection and neurodegeneration. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1808, n. 5, p. 1380–1399, maio 2011.

GONÇALVES, M. L.; CUNHA, R. A.; RIBEIRO, J. A. Adenosine A2A receptors facilitate  $45\text{Ca}^{2+}$  uptake through class A calcium channels in rat hippocampal CA3 but not CA1 synaptosomes. **Neuroscience Letters**, v. 238, n. 1-2, p. 73–77, nov. 1997.

GREENWOOD, S. M.; CONNOLLY, C. N. Dendritic and mitochondrial changes during glutamate excitotoxicity. **Neuropharmacology**, v. 53, n. 8, p. 891–898, dez. 2007.

GRIENGLING, K. K. et al. Modulation of Protein Kinase Activity and Gene Expression by Reactive Oxygen Species and Their Role in Vascular Physiology and Pathophysiology. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 20, n. 10, p. 2175–2183, out. 2000.

GUERRA, A.; ANTHONY, J. C. **Álcool e suas conseqüências : uma abordagem multiconceitual**. Barueri, Brasil: Editora Manole Ltda, 2009.

GULICK, D.; GOULD, T. J. Effects of Ethanol and Caffeine on Behavior in C57BL/6 Mice in the Plus-Maze Discriminative Avoidance Task. **Behavioral Neuroscience**, n. 123, v. 6, p. 1271–1278, 2009

HAAB LUTTE, A. et al. Early exposure to ethanol is able to affect the memory of adult zebrafish: Possible role of adenosine. **NeuroToxicology**, v. 69, p. 17–22, dez. 2018.

HALLIWELL, B.; ZHAO, K.; WHITEMAN, M. Nitric oxide and peroxynitrite. The ugly, the uglier and the not so good. **Free Radical Research**, v. 31, n. 6, p. 651–669, jan. 1999.

HAMMOND, R.; TULL, L.E.; SATCKMAN, R.W. On the delay-dependent involvement of the hippocampus in object recognition memory. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 82, n. 1, p. 26–34, jul. 2004.

HASKÓ, G. et al. Adenosine receptor signaling in the brain immune system. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 26, n. 10, p. 511–516, out. 2005.

HATHAWAY, W. R.; NEWTON, B. W. **Neuroanatomy, Prefrontal Cortex**. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK499919/>>.

HAYDEN, B. Y.; PLATT, M. L. Neurons in Anterior Cingulate Cortex Multiplex Information about Reward and Action. **The Journal of Neuroscience**, v. 30, n. 9, p. 3339–3346, 3 mar. 2010.

HECKMANN, W; SILVEIRA, C. M. Dependência do álcool: aspectos clínicos e diagnósticos. **Andrade AG, Anthony JC, Silveira CM. Álcool e suas consequências: uma abordagem multiconceitual. Barueri (SP): Minha Editora**, p. 67-87, 2009.

HEIDBREder, C. A.; GROENEWEGEN, H. J. The medial prefrontal cortex in the rat: evidence for a dorso-ventral distinction based upon functional and anatomical characteristics. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 27, n. 6, p. 555–579, out. 2003.



HERNÁNDEZ, J. A.; LÓPEZ-SÁNCHEZ, R. C.; RENDÓN-RAMÍREZ, A. Lipids and Oxidative Stress Associated with Ethanol-Induced Neurological Damage. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, p. 1–15, 2016.

HERSZAGE, J.; CENSOR, N. Modulation of Learning and Memory: A Shared Framework for Interference and Generalization. **Neuroscience**, v. 392, p. 270–280, nov. 2018.

HIRTH, N. et al. Convergent evidence from alcohol-dependent humans and rats for a hyperdopaminergic state in protracted abstinence. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 113, n. 11, p. 3024–3029, 15 mar. 2016.

HOMMER, D. W. Male and Female Sensitivity to Alcohol-Induced Brain Damage. **Alcohol Research & Health**, v. 27, n. 2, p. 181–185, 2003.

HUANG, S.; HUGANIR, R. L.; KIRKWOOD, A. Adrenergic Gating of Hebbian Spike-Timing-Dependent Plasticity in Cortical Interneurons. **Journal of Neuroscience**, v. 33, n. 32, p. 13171–13178, 7 ago. 2013.

HUGHES, R. N. Neotic preferences in laboratory rodents: Issues, assessment and substrates. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 31, n. 3, p. 441–464, jan. 2007.

HUGHES, R. N. Adult anxiety-related behavior of rats following consumption during late adolescence of alcohol alone and in combination with caffeine. **Alcohol**, v. 45, n. 4, p. 365–372, jun. 2011.

HUGHES, R. N. et al. Evidence for anxiolytic effects of acute caffeine on anxiety-related behavior in male and female rats tested with and without bright light. **Behavioural Brain Research**, v. 271, p. 7–15, set. 2014.

IGHODARO, O. M.; AKINLOYE, O. A. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. **Alexandria Journal of Medicine**, v. 54, n. 4, p. 287–293, dez. 2018.

IMAIZUMI, M. et al. Effects of theophylline in a light/dark test in p-chlorophenylalanine-treated mice. **Japanese Journal of Pharmacology**, v. 71, p. 95, 1996.

JACOBUS, J.; TAPERT, S. F. Neurotoxic Effects of Alcohol in Adolescence. **Annual Review of Clinical Psychology**, v. 9, n. 1, p. 703–721, 28 mar. 2013.

JAIN, N. et al. Anxiolytic activity of adenosine receptor activation in mice. **British Journal of Pharmacology**, v. 116, n. 3, p. 2127–2133, out. 1995.

JARVIS, M. F.; BECKER, H. C. Single and repeated episodes of ethanol withdrawal increase adenosine A1, but not A2A, receptor density in mouse brain. **Brain Research**, v. 786, n. 1-2, p. 80–88, mar. 1998.

JEROME, H.J. The concept of dependence: Historical Reflections. **Alcohol Health and Research World.**, v. 17, p. 188-190, 1993.

JIANG, Y. et al. Alcohol Metabolizing Enzymes, Microsomal Ethanol Oxidizing System, Cytochrome P450 2E1, Catalase, and Aldehyde Dehydrogenase in Alcohol-Associated Liver Disease. **Biomedicines**, v. 8, n. 3, p. 50, 4 mar. 2020.

JOHANSSON, B. et al. Hyperalgesia, anxiety, and decreased hypoxic neuroprotection in mice lacking the adenosine A1 receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 16, p. 9407–9412, 24 jul. 2001.

JOHNSON, M. H. The inhibition of automatic saccades in early infancy. **Developmental Psychobiology**, v. 28, n. 5, p. 281–291, jul. 1995.

JONES, S. A.; LUERAS, J. M.; NAGEL, B. J. Effects of Binge Drinking on the Developing Brain. **Alcohol Research : Current Reviews**, v. 39, n. 1, p. 87–96, 1 jan. 2018.

JONES, A. W. Alcohol, its absorption, distribution, metabolism, and excretion in the body and pharmacokinetic calculations. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Forensic Science**, v. 1, n. 5, 20 maio 2019.

KALIVAS, P. Glutamate systems in cocaine addiction. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 4, n. 1, p. 23–29, fev. 2004.

KAPLAN, G. B. et al. Role of Adenosine A1 and A2A Receptors in the Alcohol Withdrawal Syndrome. **Alcohol**, v. 19, n. 2, p. 157–162, out. 1999.

KARL, T.; PABST, R.; VON HÖRSTEN, S. Behavioral phenotyping of mice in pharmacological and toxicological research. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 55, n. 1, p. 69–83, jan. 2003.

KASTER, M. P. et al. Caffeine acts through neuronal adenosine A2A receptors to prevent mood and memory dysfunction triggered by chronic stress. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 25, p. 7833–7838, 8 jun. 2015.

KERKHOF, A. et al. Adenosine A2A Receptors Control Glutamatergic Synaptic Plasticity in Fast Spiking Interneurons of the Prefrontal Cortex. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, 20 mar. 2018.

KHADRAWY, Y. A. et al. Neuroprotective and Therapeutic Effect of Caffeine on the Rat Model of Parkinson's Disease Induced by Rotenone. **Journal of Dietary Supplements**, v. 14, n. 5, p. 553–572, 13 fev. 2017.

KIHLMAN, B. A. **Caffeine and Chromosomes**. Amsterdam;New York. Elsevier Science & Technology, 1977.

KINTER, M.; ROBERTS, R. J. Glutathione consumption and glutathione peroxidase inactivation in fibroblast cell lines by 4-hydroxy-2-nonenal. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 21, n. 4, p. 457–462, 1 jan. 1996.

KISELEVSKI, Y. et al. Acetate metabolism in brain mechanisms of adaptation to ethanol. **Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research**, v. 9, n. 5, p. BR178-182, 1 maio 2003.

KOESLING, D. et al. NO/cGMP signalling in hippocampal glutamatergic neurons. **Nitric Oxide**, v. 27, p. S3, jul. 2012.

KROENER, S. et al. Chronic Alcohol Exposure Alters Behavioral and Synaptic Plasticity of the Rodent Prefrontal Cortex. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p. e37541, 30 maio 2012.

KULKARNI, S. K.; SINGH, K.; BISHNOI, M. Involvement of adenosinergic receptors in anxiety related behaviours. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 45, n. 5, p. 439–443, 1 maio 2007.

KUNTSCHKE, E.; REHM, J.; GMEL, G. Characteristics of binge drinkers in Europe. **Social Science & Medicine**, v. 59, n. 1, p. 113–127, jul. 2004.

KURIBARA, H.; ASAHI, T.; TADOKORO, S. Ethanol enhances, but diazepam and pentobarbital reduce the ambulation-increasing effect of caffeine in mice. **Arukoro Kenkyuto Yakubutsu Ison**. n.27, v.5, p. 528-539. Oct 1992.

LARANJEIRA, R.; ROMANO, M. Brazilian consensus on public policies on alcohol. **Brazilian Journal of Psychiatry**, v. 26, p. 68–77, 1 maio 2004.

LAURENT, C. et al. Beneficial effects of caffeine in a transgenic model of Alzheimer's disease-like tau pathology. **Neurobiology of aging**, v. 35, n. 9, p. 2079–90, 2014a.

LAURENT, C. et al. A2A adenosine receptor deletion is protective in a mouse model of Tauopathy. **Molecular Psychiatry**, v. 21, n. 1, p. 97–107, 2 dez. 2014b.

LEBEL, C.; BEAULIEU, C. Longitudinal Development of Human Brain Wiring Continues from Childhood into Adulthood. **Journal of Neuroscience**, v. 31, n. 30, p. 10937–10947, 27 jul. 2011.

LEE, J. L. C.; NADER, K.; SCHILLER, D. An Update on Memory Reconsolidation Updating. **Trends in Cognitive Sciences**, v. 21, n. 7, p. 531–545, 1 jul. 2017.

LEITE, M. R. et al. Protective effect of caffeine and a selective A2A receptor antagonist on impairment of memory and oxidative stress of aged rats. **Experimental Gerontology**, v. 46, n. 4, p. 309–315, abr. 2011.

LESTING, J. et al. Patterns of Coupled Theta Activity in Amygdala-Hippocampal-Prefrontal Cortical Circuits during Fear Extinction. **PLoS ONE**, v. 6, n. 6, p. e21714, 28 jun. 2011.

LEVANTAMENTO NACIONAL DE ÁLCOOL E DROGAS (II LENAD) – 2012. Ronaldo Laranjeira (Supervisão) et al. São Paulo: **Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Políticas Públicas de Álcool e Outras Drogas (INPAD)**, UNIFESP. 2014.

LEWIN, E.; BLECK, V. Electroshock Seizures in Mice: Effect on Brain Adenosine and Its Metabolites. **Epilepsia**, v. 22, n. 5, p. 577–581, out. 1981.

LISDAHL, K. M. et al. Recent binge drinking predicts smaller cerebellar volumes in adolescents. **Psychiatry Research: Neuroimaging**, v. 211, n. 1, p. 17–23, jan. 2013.

LISTON, C.; MCEWEN, B. S.; CASEY, B. J. Psychosocial stress reversibly disrupts prefrontal processing and attentional control. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 3, p. 912–917, 12 jan. 2009.

LIU, W. et al. Excitotoxicity and oxidative damages induced by methylmercury in rat cerebral cortex and the protective effects of tea polyphenols. **Environmental Toxicology**, v. 29, n. 3, p. 269–283, 5 jan. 2014.

LÓPEZ-CRUZ, L.; SALAMONE, J. D.; CORREA, M. The Impact of Caffeine on the Behavioral Effects of Ethanol Related to Abuse and Addiction: A Review of Animal Studies. **Journal of Caffeine Research**, v. 3, n. 1, p. 9–21, mar. 2013.

LÓPEZ-CRUZ, L. et al. Adenosine A2A receptor deletion affects social behaviors and anxiety in mice: Involvement of anterior cingulate cortex and amygdala. **Behavioural Brain Research**, v. 321, p. 8–17, mar. 2017.

LOZANO, A. M. et al. Basal ganglia physiology and deep brain stimulation. **Movement Disorders**, v. 25, n.1, p. p.71–75, 2010.

LU, J. . et al. Spike-Timing-Dependent Plasticity of Neocortical Excitatory Synapses on Inhibitory Interneurons Depends on Target Cell Type. **Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 36, p. 9711–9720, 5 set. 2007.

LU, Y.; CEDERBAUM, A. I. Cytochrome P450S and Alcoholic Liver Disease. **Current Pharmaceutical Design**, v. 24, n. 14, p. 1502–1517, 13 jul. 2018.

MAIA, C. et al. Prolonged caffeine intake decreases alveolar bone damage induced by binge-like ethanol consumption in adolescent female rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 130, p. 110608, out. 2020.

MASKELL, P. D. et al. Evidence based survey of the distribution volume of ethanol: Comparison of empirically determined values with anthropometric measures. **Forensic Science International**, v. 294, p. 124–131, jan. 2019.

MCEWEN, B. S. Understanding the potency of stressful early life experiences on brain and body function. **Metabolism**, v. 57, p. S11–S15, out. 2008.

MCCOOL, B. A. Ethanol modulation of synaptic plasticity. **Neuropharmacology**, v. 61, n. 7, p. 1097–1108, dez. 2011.

MCQUEENY, T. et al. Altered White Matter Integrity in Adolescent Binge Drinkers. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 33, n. 7, p. 1278–1285, jul. 2009.

MENG, Z.-H.; DAR, M. S. Possible Role of Striatal Adenosine in the Modulation of Acute Ethanol-Induced Motor Incoordination in Rats. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 19, n. 4, p. 892–901, ago. 1995.

MILLS, K. L. et al. The Developmental Mismatch in Structural Brain Maturation during Adolescence. **Developmental Neuroscience**, v. 36, n. 3-4, p. 147–160, 2014.

MONOPOLI, A. et al. 1998. "Blockade of A2A adenosine receptors by SCH 58261 results in neuroprotective effect in cerebral ischemia in mice", **NeuroReport**. v.9, p. 3955-3959, 1998.



MONTESINOS, J. et al. Involvement of TLR4 in the long-term epigenetic changes, rewarding and anxiety effects induced by intermittent ethanol treatment in adolescence. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 53, p. 159–171, mar. 2016.

MOREAN, M. E. et al. Age at drinking onset, age at first intoxication, and delay to first intoxication: Assessing the concurrent validity of measures of drinking initiation with alcohol use and related problems. **Addictive Behaviors**, v. 79, p. 195–200, abr. 2018.

MORELLI, M.; WARDAS, J. Adenosine A2A receptor antagonists: potential therapeutic neuroprotective effects in parkinson's disease. **Neurotoxicity Research**, n.3, v. 6, p. 545-556, 2001.

MURTY, V.; CALABRO, F.; LUNA, B. The Role of Experience in Adolescent Cognitive Development: Integration of Executive, Memory, and Mesolimbic Systems. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 70, p. 46–58, 1 nov. 2016.

NAGEL, B. J. et al. Reduced hippocampal volume among adolescents with alcohol use disorders without psychiatric comorbidity. **Psychiatry Research: Neuroimaging**, v. 139, n. 3, p. 181–190, ago. 2005.

NAGY, L. E. et al. Ethanol increases extracellular adenosine by inhibiting adenosine uptake via the nucleoside transporter. **Journal of Biological Chemistry**, v. 265, n. 4, p. 1946–1951, fev. 1990.

NAM, H. W. et al. Adenosine Transporter ENT1 Regulates the Acquisition of Goal-Directed Behavior and Ethanol Drinking through A2A Receptor in the Dorsomedial Striatum. **Journal of Neuroscience**, v. 33, n. 10, p. 4329–4338, 6 mar. 2013.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. "PubChem Compound Summary for CID 2519, Caffeine" PubChem, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Caffeine>. Accessed 4 November, 2022.

NATIONAL INSTITUTE ON ALCOHOL ABUSE AND ALCOHOLISM (NIAAA). **Publications. Disponível em:** <<https://pubs.niaaa.nih.gov/publications/aa72/aa72.htm>>. Accessed October 22, 2015

NATIONAL INSTITUTE ON ALCOHOL ABUSE AND ALCOHOLISM (NIAAA). **Defining binge drinking. What Colleges Need to Know Now. Disponível em:** [https://www.collegedrinkingprevention.gov/media/1College\\_Bulletin-508\\_361C4E.pdf](https://www.collegedrinkingprevention.gov/media/1College_Bulletin-508_361C4E.pdf). Accessed October 22, 2021.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (US) COMMITTEE FOR THE UPDATE OF THE GUIDE FOR THE CARE AND USE OF LABORATORY ANIMALS. **Guide for the Care and Use of Laboratory Animals**. Washington, D.C.: National Academies Press, 2011.

NIKOLIC, J.; BJELAKOVIC, G.; STOJANOVIC, I. Effect of caffeine on metabolism of L-arginine in the brain. **Guanidino Compounds in Biology and Medicine**, v. 40, p. 125–128, 2003.

NUTT, D. J. The pharmacology of human anxiety. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 47, n. 2, p. 233–266, jan. 1990.

OLIVEIRA, G. B. et al. Minocycline mitigates motor impairments and cortical neuronal loss induced by focal ischemia in rats chronically exposed to ethanol during adolescence. **Brain Research**, v. 1561, p. 23–34, maio 2014.

OLIVEIRA, A. C. et al. Chronic ethanol exposure during adolescence through early adulthood in female rats induces emotional and memory deficits associated with morphological and molecular alterations in hippocampus. *Journal of Psychopharmacology*, v. 29, n. 6, p. 712–724, jun. 2015.

OLIVEIRA, A. N. et al. Unravelling motor behaviour hallmarks in intoxicated adolescents: methylmercury subtoxic-dose exposure and binge ethanol intake paradigm in rats. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 22, p. 21937–21948, 24 maio 2018.

OLSEN, R. W.; LIANG, J. Role of GABAA receptors in alcohol use disorders suggested by chronic intermittent ethanol (CIE) rodent model. **Molecular Brain**, v. 10, n. 1, 20 set. 2017.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **Global status report on alcohol and health**, 2014. Geneva: World Health Organization, 2014.

OTHMAN, T. et al. A preliminary investigation of the effects of maternal ethanol intake during gestation and lactation on brain adenosine A1 receptor expression in rat offspring. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 24, n. 2, p. 275–279, mar. 2002.

OTHMAN, T.; YAN, H.; RIVKEES, S. A. Oligodendrocytes express functional A1 adenosine receptors that stimulate cellular migration. **Glia**, v. 44, n. 2, p. 166–172, 23 set. 2003.

PAGNUSSAT, N. et al. Adenosine A<sub>2A</sub> receptors are necessary and sufficient to trigger memory impairment in adult mice. **British Journal of Pharmacology**, v. 172, n. 15, p. 3831–3845, 26 jun. 2015.

PANDEY, S. C. et al. Potential role of adolescent alcohol exposure-induced amygdaloid histone modifications in anxiety and alcohol intake during adulthood. **Neurobiology of Disease**, v. 82, p. 607–619, out. 2015.

PANDOLFO, P. et al. Caffeine regulates frontocortico-striatal dopamine transporter density and improves attention and cognitive deficits in an animal model of attention deficit hyperactivity disorder. **European Neuropsychopharmacology**, v. 23, n. 4, p. 317–328, abr. 2013.

PARDO, M. et al. Acetate as an active metabolite of ethanol: studies of locomotion, loss of righting reflex, and anxiety in rodents. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 7, 2013.

PASCUAL, M. et al. Repeated alcohol administration during adolescence causes changes in the mesolimbic dopaminergic and glutamatergic systems and promotes alcohol intake in the adult rat. **Journal of Neurochemistry**, v. 108, n. 4, p. 920–931, fev. 2009.

PATKI, G. et al. Potential role of anxiety and stress in aggressive behavior in rats (839.2). **The FASEB Journal**, v. 28, n. S1, abr. 2014.

PAUL, S. et al. Adenosine A<sub>1</sub> Receptors in the Central Nervous System: Their Functions in Health and Disease, and Possible Elucidation by PET Imaging. **Current Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 31, p. 4820–4835, 1 nov. 2011.

PAUS, T.; KESHAVAN, M.; GIEDD, J. N. Why do many psychiatric disorders emerge during adolescence? **Nature Reviews Neuroscience**, v. 9, n. 12, p. 947–957, 12 nov. 2008.

PEANA, A. T. et al. Mystic Acetaldehyde: The Never-Ending Story on Alcoholism. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 0, 2017.

PELLOW, S.; FILE, S. E. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: A novel test of anxiety in the rat. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 24, n. 3, p. 525–529, mar. 1986.

PERCÁRIO, S. Dosagem das LDLs modificadas através da peroxidação lipídica: correlação com o risco aterogênico. **AMHFFCMSCSP**, n. 3 (49-52), p. 07-09, 1994

PELTIER, M. R. et al. Sex differences in stress-related alcohol use. **Neurobiology of Stress**, v. 10, p. 100149, fev. 2019.

PINHEIRO, B. G. et al. The Role of the Adenosine System on Emotional and Cognitive Disturbances Induced by Ethanol Binge Drinking in the Immature Brain and the Beneficial Effects of Caffeine. **Pharmaceuticals**, v. 15, n. 11, p. 1323, 1 nov. 2022.

PINSKY, I. et al. Patterns of alcohol use among Brazilian adolescents. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 32, n. 3, p. 242–249, 30 abr. 2010.

PINTOR, A. et al. Adenosine A2A receptor antagonists prevent the increase in striatal glutamate levels induced by glutamate uptake inhibitors. **Journal of Neurochemistry**, v. 89, n. 1, p. 152–156, abr. 2004.

PIRES, V. A. et al. Adenosine receptor antagonists improve short-term object-recognition ability of spontaneously hypertensive rats: a rodent model of attention-deficit hyperactivity disorder. **Behavioural Pharmacology**, v. 20, n. 2, p. 134–145, mar. 2009.

PREDIGER, R. D. S.; BATISTA, L. C.; TAKAHASHI, R. N. Adenosine A1 receptors modulate the anxiolytic-like effect of ethanol in the elevated plus-maze in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 499, n. 1-2, p. 147–154, set. 2004.

PREDIGER, R. D. S. et al. Activation of Adenosine A1 Receptors Reduces Anxiety-Like Behavior During Acute Ethanol Withdrawal (Hangover) in Mice. **Neuropsychopharmacology**, v. 31, n. 10, p. 2210–2220, 11 jan. 2006.

REBOLA, N.; OLIVEIRA, C. R.; CUNHA, R. A. Transducing system operated by adenosine A2A receptors to facilitate acetylcholine release in the rat hippocampus. **European Journal of Pharmacology**, v. 454, n. 1, p. 31–38, nov. 2002.

REBOLA, N. et al. Enhanced Adenosine A<sub>2A</sub> Receptor Facilitation of Synaptic Transmission in the Hippocampus of Aged Rats. **Journal of Neurophysiology**, v. 90, n. 2, p. 1295–1303, ago. 2003.

REBOLA, N. et al. Adenosine A2A Receptors Are Essential for Long-Term Potentiation of NMDA-EPSCs at Hippocampal Mossy Fiber Synapses. **Neuron**, v. 57, n. 1, p. 121–134, jan. 2008.

REDDY, S. K. et al. Dose response of ethanol ingestion on antioxidant defense system in rat brain subcellular fractions. **Neurotoxicology**, v. 20, n. 6, p. 977–987, 1 dez. 1999.

REIS, S. L. et al. Adenosine A<sub>1</sub> and A<sub>2A</sub> receptors differently control synaptic plasticity in the mouse dorsal and ventral hippocampus. **Journal of Neurochemistry**, v. 151, n. 2, p. 227–237, 2 ago. 2019.

RIBEIRO, J. What can Adenosine Neuromodulation do for Neuroprotection? **Current Drug Target -CNS & Neurological Disorders**, v. 4, n. 4, p. 325–329, 1 ago. 2005.

RIBEIRO, J. A.; SEBASTIÃO, A. M.; DE MENDONÇA, A. Adenosine receptors in the nervous system: pathophysiological implications. **Progress in Neurobiology**, v. 68, n. 6, p. 377–392, dez. 2002.

ROBLEDO, P.; URSU, G.; MAHY, N. Effects of adenosine and  $\gamma$ -aminobutyric acid a receptor antagonists on N-methyl-D-aspartate induced neurotoxicity in the rat hippocampus. **Hippocampus**, v. 9, n. 5, p. 527–533, 1999.

RODRIGUES, K. E. et al. Aqueous Coriandrum sativum L. extract promotes neuroprotection against motor changes and oxidative damage in rat progeny after maternal exposure to methylmercury. **Food and Chemical Toxicology**, v. 133, p. 110755, nov. 2019.

RUDY, B. et al. Three Groups of Interneurons Account for Nearly 100% of Neocortical GABAergic Neurons. **Developmental neurobiology**, v. 71, n. 1, p. 45–61, 1 jan. 2011.

RUFINO, M. do S. M et al. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre ABTS+ [Determination of total antioxidant activity in fruits by capturing the free radical ABTS+]. **Embrapa Agroindústria Tropical-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**, 2007.

SABETI, J.; GRUOL, D. L. Emergence of NMDAR-independent long-term potentiation at hippocampal CA1 synapses following early adolescent exposure to chronic intermittent ethanol: Role for sigma-receptors. **Hippocampus**, v. 18, n. 2, p. 148–168, 2008.

SALAMONE, J. D. et al. THE BEHAVIORAL PHARMACOLOGY OF EFFORT-RELATED CHOICE BEHAVIOR: DOPAMINE, ADENOSINE AND BEYOND. **Journal of the Experimental Analysis of Behavior**, v. 97, n. 1, p. 125–146, jan. 2012.

SALIM, S. Oxidative Stress and the Central Nervous System. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 360, n. 1, p. 201–205, 17 out. 2016.

SANTIAGO, A. R. et al. Keep an eye on adenosine: Its role in retinal inflammation. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 210, p. 107513, jun. 2020.

SANTOS, L. C. et al. Irish coffee: Effects of alcohol and caffeine on object discrimination in zebrafish. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 143, p. 34–43, abr. 2016.

SAUDARGIENE, A.; COBB, S.; GRAHAM, B. P. A computational study on plasticity during theta cycles at Schaffer collateral synapses on CA1 pyramidal cells in the hippocampus. **Hippocampus**, v. 25, n. 2, p. 208–218, 25 set. 2014.

SCHUBERT, P.; RUDOLPHI, K. Interfering with the pathologic activation of microglial cells and astrocytes in dementia. **Alzheimer Disease and Associated Disorders**, v. 12 Suppl 2, p. S21-28, 1998.

SCHALCHER, T. R. et al. Clinical Oxidative Stress during Leprosy Multidrug Therapy:



Impact of Dapsone Oxidation. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, p. e85712, 2014.

SCHWARZSCHILD, M. A. et al. Targeting adenosine A2A receptors in Parkinson's disease. **Trends in Neurosciences**, v. 29, n. 11, p. 647–654, nov. 2006.

SEBASTIÃO, A. M.; RIBEIRO, J. A. Adenosine Receptors and the Central Nervous System. **Adenosine Receptors in Health and Disease**, p. 471–534, 2009.

SEITZ, H. High Blood Alcohol Levels in Women. **New England Journal of Medicine**, v. 323, n. 1, p. 58–62, 5 jul. 1990.

SEKERES, M. J.; WINOCUR, G.; MOSCOVITCH, M. The hippocampus and related neocortical structures in memory transformation. **Neuroscience Letters**, v. 680, p. 39–53, 27 jul. 2018.

SHAH, U. et al. Biaryl and heteroaryl derivatives of SCH 58261 as potent and selective adenosine A2A receptor antagonists. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 18, n. 14, p. 4199–4203, 1 jul. 2008.

SIGURDSSON, T.; DUVARCI, S. Hippocampal-Prefrontal Interactions in Cognition, Behavior and Psychiatric Disease. **Frontiers in Systems Neuroscience**, v. 9, 26 jan. 2016.

SIMMONDS, D. J.; HALLQUIST, M. N.; LUNA, B. Protracted development of executive and mnemonic brain systems underlying working memory in adolescence: A longitudinal fMRI study. **NeuroImage**, v. 157, p. 695–704, ago. 2017.

SLAWECKI, C. J.; BETANCOURT, M. Effects of adolescent ethanol exposure on ethanol consumption in adult rats. **Alcohol**, v. 26, n. 1, p. 23–30, jan. 2002.

SMITH, S. S.  $\alpha 4\beta\delta$  GABAA receptors and tonic inhibitory current during adolescence: effects on mood and synaptic plasticity. **Frontiers in Neural Circuits**, v. 7, 2013.

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

SPERLAGH, B.; VIZI, E. S. The Role of Extracellular Adenosine in Chemical Neurotransmission in the Hippocampus and Basal Ganglia: Pharmacological and Clinical Aspects. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 8, p. 1034–1046, 2011.

SPINETTA, M. J. et al. Alcohol-induced retrograde memory impairment in rats: prevention by caffeine. **Psychopharmacology**, v. 201, n. 3, p. 361–371, 29 ago. 2008.

SQUIRE, L. R. Memory and the hippocampus: A synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. **Psychological Review**, v. 99, n. 2, p. 195–231, 1992.

STONER, G. R. et al. Preferential effects of caffeine on limbic and cortical dopamine systems. **Biological Psychiatry**, v. 23, n. 8, p. 761–768, abr. 1988.

STAZI, M. et al. Long-term caffeine treatment of Alzheimer mouse models ameliorates behavioural deficits and neuron loss and promotes cellular and molecular markers of neurogenesis. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 79, n. 1, 16 dez. 2021.

STONE, T.W.; BEHAN, W.M.H. "Adenosine receptors, kynurenines and neuroprotection", **Drug Dev. Res.** 50, 15, 2000.

SOARES, P. M. et al. Aminophylline (a theophylline–ethylenediamine complex) blocks ethanol behavioral effects in mice. **Behavioural Pharmacology**, v. 20, n. 4, p. 297–302, jul. 2009.

SOLANKI, N. et al. Grape powder prevents cognitive, behavioral, and biochemical impairments in a rat model of posttraumatic stress disorder. **Nutrition Research**, v. 35, n. 1, p. 65–75, jan. 2015.

SPEAR, L. P. Effects of adolescent alcohol consumption on the brain and behaviour. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 19, n. 4, p. 197–214, 15 fev. 2018.

STEINBERG, L. Cognitive and affective development in adolescence. **Trends in Cognitive Sciences**, v. 9, n. 2, p. 69–74, fev. 2005.

STEPHENS, D. N. et al. Repeated Ethanol Exposure and Withdrawal Impairs Human Fear Conditioning and Depresses Long-Term Potentiation in Rat Amygdala and Hippocampus. **Biological Psychiatry**, v. 58, n. 5, p. 392–400, set. 2005.

SQUEGLIA, L. M. et al. Binge drinking differentially affects adolescent male and female brain morphometry. **Psychopharmacology**, v. 220, n. 3, p. 529–539, 28 set. 2011.

STELLA, F. et al. Self-organization of multiple spatial and context memories in the hippocampus. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 36, n. 7, p. 1609–1625, ago. 2012.

STORR, C. L.; PACEK, L. R.; MARTINS, S. S. Substance Use Disorders and Adolescent Psychopathology. **Public Health Reviews**, v. 34, n. 2, dez. 2012.

STRANGE, B. A. et al. Functional organization of the hippocampal longitudinal axis. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 15, n. 10, p. 655–669, 19 set. 2014.

SVENNINGSSON, P.; JOHANSSON, B.; FREDHOLM, B. B. Caffeine-induced expression of c-fos mRNA and NGFI-A mRNA in caudate putamen and in nucleus accumbens are differentially affected by the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist MK-801. **Molecular Brain Research**, v. 35, n. 1-2, p. 183–189, 1996.

TAKAHASHI, R. N. Adenosine receptor antagonists for cognitive dysfunction: a review of animal studies. **Frontiers in Bioscience**, v. 13, n. 13, p. 2614, 2008.

TAMNES, C. K. et al. Longitudinal Working Memory Development Is Related to Structural Maturation of Frontal and Parietal Cortices. **Journal of Cognitive Neuroscience**, v. 25, n. 10, p. 1611–1623, out. 2013.

TANG, Y.-P. et al. Genetic enhancement of learning and memory in mice. **Nature**, v. 401, n. 6748, p. 63–69, set. 1999.

TANG, L.; SHAFER, A. T.; OFEN, N. Prefrontal Cortex Contributions to the Development of Memory Formation. **Cerebral Cortex**, v. 28, n. 9, p. 3295–3308, 9 ago. 2017.

TAPERT, S. F.; CALDWELL, L.; BURKE, C. Alcohol and the Adolescent Brain. **Alcohol Research & Health**, v. 28, n. 4, p. 205–212, 2004.

TEMIDO-FERREIRA, M. et al. Age-related shift in LTD is dependent on neuronal adenosine A2A receptors interplay with mGluR5 and NMDA receptors. **Molecular Psychiatry**, v. 25, n. 8, p. 1876–1900, 27 jun. 2018.

TEMIDO-FERREIRA, M. et al. Novel Players in the Aging Synapse: Impact on Cognition. **Journal of Caffeine and Adenosine Research**, v. 9, n. 3, p. 104–127, 1 set. 2019.

THOMPSON, S. M.; HAAS, H. L.; GÄHWILER, B. H. Comparison of the actions of adenosine at pre- and postsynaptic receptors in the rat hippocampus in vitro. **The Journal of Physiology**, v. 451, n. 1, p. 347–363, 1 jun. 1992.

TOMSOVIC, M. “Binge” and Continuous Drinkers; Characteristics and Treatment Follow-Up. **Quarterly Journal of Studies on Alcohol**, v. 35, n. 2, p. 558–564, 1 jun. 1974.

TORCASO, A. et al. Adolescent binge alcohol exposure increases risk assessment behaviors in male Wistar rats after exposure to an acute psychological stressor in adulthood. **Psychoneuroendocrinology**, v. 76, p. 154–161, fev. 2017.

TORRICO, T. J.; ABDIJADID, S. **Neuroanatomy, Limbic System**. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538491/>>.

TOWNER, T. T.; VARLINSKAYA, E. I. Adolescent Ethanol Exposure: Anxiety-Like Behavioral Alterations, Ethanol Intake, and Sensitivity. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 14, 31 mar. 2020.

TREASURY USES NEW SANCTIONS AUTHORITY TO COMBAT GLOBAL ILLICIT DRUG TRADE. **Disponível em:** <<https://home.treasury.gov/news/press-releases/jy0535>>. Acesso em: 26 jul. 2022.

UYLINGS, H. B. M.; GROENEWEGEN, H. J.; KOLB, B. Do rats have a prefrontal cortex? **Behavioural Brain Research**, v. 146, n. 1, p. 3–17, 30 nov. 2003.

VAN CALKER, D.; BIBER, K. The Role of Glial Adenosine Receptors in Neural Resilience and the Neurobiology of Mood Disorders. **Neurochemical Research**, v. 30, n. 10, p. 1205–1217, out. 2005.

VARLINSKAYA, E. I.; TRUXELL, E.; SPEAR, L. P. Chronic intermittent ethanol exposure during adolescence: Effects on social behavior and ethanol sensitivity in adulthood. **Alcohol**, v. 48, n. 5, p. 433–444, ago. 2014.

VARGAS, D. DE; OLIVEIRA, M. A. F. DE; ARAÚJO, E. C. Prevalência de dependência alcoólica em serviços de atenção primária à saúde de Bebedouro, São Paulo, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 25, n. 8, p. 1711–1720, ago. 2009.

VASCONCELOS, J. B. et al. Screening for antioxidant capacity of tropical reef seaweeds: prospection for new natural antioxidants. **Trop. Oceanogr.**, v. 45, p. 16-30, 2017.

VIANA DA SILVA, S. et al. Early synaptic deficits in the APP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease involve neuronal adenosine A2A receptors. **Nature Communications**, v. 7, n. 1, 17 jun. 2016.

VETRENO, R. P. et al. Adolescent, but Not Adult, Binge Ethanol Exposure Leads to Persistent Global Reductions of Choline Acetyltransferase Expressing Neurons in Brain. **PLoS ONE**, v. 9, n. 11, p. e113421, 18 nov. 2014.

VIALA-ARTIGUES, J.; MECHETTI, C. **Histoire de l'alcool archéologie partie 1**. 2003. Disponível em: <[http://www.alcoologie.org/documentation/article.php3?id\\_article=118](http://www.alcoologie.org/documentation/article.php3?id_article=118)> Acesso em 26 fev. 2018.

WALDECK, B. Ethanol and caffeine: A complex interaction with respect to locomotor activity and central catecholamines. **Psychopharmacologia**, v. 36, n. 3, p. 209–220, 1974.

WANG, X; MICHAELIS, E. K. Selective neuronal vulnerability to oxidative stress in the brain. *Frontiers in aging neuroscience*, v. 2, p. 12, 2010.

WANG, X. et al. Distribution of CaMKII $\alpha$  expression in the brain in vivo, studied by CaMKII $\alpha$ -GFP mice. **Brain Research**, v. 1518, p. 9–25, jun. 2013.

WARD, R. J.; LALLEMAND, F.; DE WITTE, P. Biochemical and Neurotransmitter Changes Implicated in Alcohol-Induced Brain Damage in Chronic or “Binge Drinking” Alcohol Abuse. **Alcohol and Alcoholism**, v. 44, n. 2, p. 128–135, 20 jan. 2009.

WEST, R. K.; MAYNARD, M. E.; LEASURE, J. L. Binge ethanol effects on prefrontal cortex neurons, spatial working memory and task-induced neuronal activation in male and female rats. **Physiology & Behavior**, v. 188, p. 79–85, maio 2018.

WHITE, A. M.; MATTHEWS, D. B.; BEST, P. J. Ethanol, memory, and hippocampal function: A review of recent findings. **Hippocampus**, v. 10, n. 1, p. 88–93, 2000.

WILLIAMS, M. **Adenosine**. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780080552323611699>>. Acesso em: 1 ago. 2022.

XIE, S. et al. Adolescent anxiety disorders and the developing brain: comparing neuroimaging findings in adolescents and adults. **General Psychiatry**, v. 34, n. 4, 4 ago. 2021.

YACOUBI, M. E. et al. The anxiogenic-like effect of caffeine in two experimental procedures measuring anxiety in the mouse is not shared by selective A<sub>2A</sub> adenosine receptor antagonists. **Psychopharmacology**, v. 148, n. 2, p. 153–163, 4 fev. 2000.

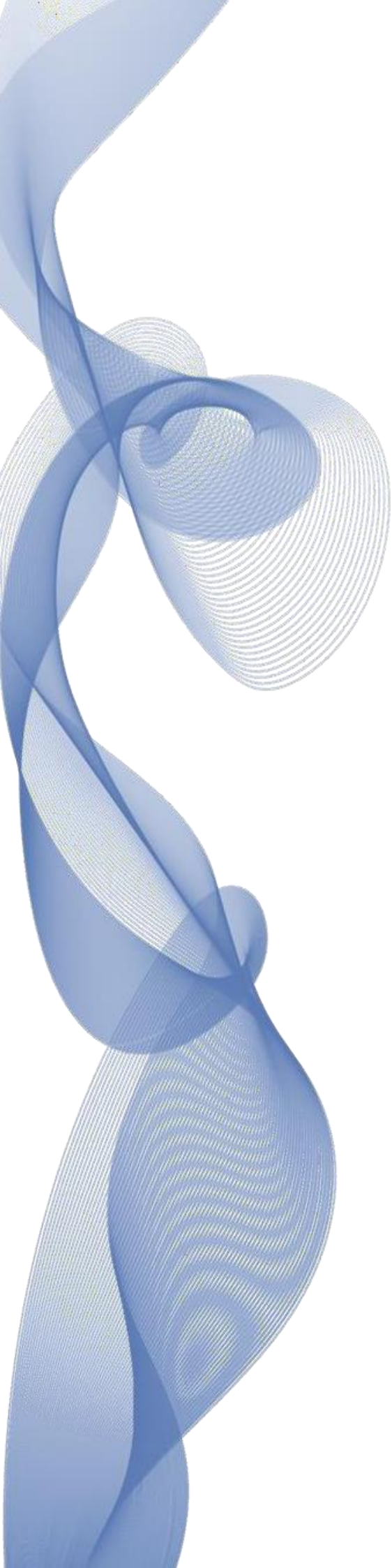
YAMATO, T. et al. Modulation of the stress response by coffee: an in vivo microdialysis study of hippocampal serotonin and dopamine levels in rat. **Neuroscience Letters**, v. 332, n. 2, p. 87–90, out. 2002.



YANG et al. Characterization of the potency, selectivity, and pharmacokinetic profile for six adenosine A<sub>2A</sub> receptor antagonists. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* v.375, p.133–144, 2007.

ZAKHARI, S. Alcohol metabolism and epigenetics changes. ***Alcohol Research: Current Reviews***, v. 35, n. 1, p. 6–16, 2013.

ZIMATKIN, S. M. et al. Enzymatic Mechanisms of Ethanol Oxidation in the Brain. ***Alcoholism: Clinical and Experimental Research***, v. 30, n. 9, p. 1500–1505, set.



---

---

**VIII. ANEXOS**

---

---

## ANEXO – A (MAIA et al., 2020) – produção científica

Biomedicine &amp; Pharmacotherapy 130 (2020) 110608



Contents lists available at ScienceDirect

Biomedicine &amp; Pharmacotherapy

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/bioph](http://www.elsevier.com/locate/bioph)

Original article

## Prolonged caffeine intake decreases alveolar bone damage induced by binge-like ethanol consumption in adolescent female rats



Cristiane Maia<sup>a,\*</sup>, Bruno Gonçalves Pinheiro<sup>b</sup>, Carla Cristiane Soares da Silva<sup>b</sup>, Rodrigo A. Cunha<sup>b</sup>, Deiweson Souza-Monteiro<sup>c</sup>, Maria Karolina Martins Ferreira<sup>c</sup>, Tuany Rafaeli Schmidt<sup>d</sup>, Gabriela de Souza Balbinot<sup>e</sup>, Fabrício Mezzomo Collares<sup>e</sup>, Manoela Domingues Martins<sup>d</sup>, Rafael Rodrigues Lima<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Laboratory of Pharmacology of Inflammation and Behavior, Faculty of Pharmacy, Institute of Health Science, Federal University of Pará, Belém, Pará, Brazil

<sup>b</sup> CNC-Center for Neurosciences and Cell Biology, Faculty of Medicine, University of Coimbra, Portugal

<sup>c</sup> Laboratory of Functional and Structural Biology, Biological Science Institute, Federal University of Pará, Belém, Pará, Brazil

<sup>d</sup> Department of Oral Pathology, School of Dentistry, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

<sup>e</sup> Department of Dental Materials, School of Dentistry, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

## ARTICLE INFO

## Keywords:

Binge drinking  
Caffeine  
Adenosine  $A_{2A}$  receptor  
Adolescence  
Alveolar bone loss  
Periodontitis

## ABSTRACT

Ethanol consumption has been reported to negatively impact on periodontal disease. In particular, oral cavity disorders occur upon ethanol exposure during adolescence, a life period associated with particular patterns of short and intense ('binge-like') ethanol consumption that is most deleterious to oral health. The hazardous central effects of ethanol have been linked to the overfunction of adenosine receptors, which are antagonized by caffeine, a bioactive substance present in numerous natural nutrients, which can also modify bone metabolism. The aim of this study was to investigate the effects of caffeine on alveolar bone damage induced by an ethanol binge drinking paradigm during adolescence. Female Wistar rats (35 days old;  $n = 30$ ) were allocated to six groups: control (vehicle), ethanol (3 g/kg/day; 3 days On-4 days Off challenge), caffeine (10 mg/kg/day), caffeine plus ethanol, SCH58261 (0.1 mg/kg/day, an antagonist of  $A_{2A}$  receptors), and SCH58261 plus ethanol. Bone micromorphology and vertical bone loss were analyzed by computed microtomography. Our data showed that ethanol binge drinking reduced alveolar bone quality, with repercussion on alveolar bone size. This ethanol-induced alveolar bone deterioration was abrogated upon treatment with caffeine, but not with SCH58261. This shows that caffeine prevented the periodontal disorder caused by ethanol binge drinking during adolescence, an effect that was not mediated by adenosine  $A_{2A}$  receptor blockade.



Review

# The Role of the Adenosine System on Emotional and Cognitive Disturbances Induced by Ethanol Binge Drinking in the Immature Brain and the Beneficial Effects of Caffeine

Bruno Gonçalves Pinheiro <sup>1,2,3</sup>, Diandra Araújo Luz <sup>2,3</sup>, Sabrina de Carvalho Cartágenes <sup>1,2,3</sup>, Luanna de Melo Pereira Fernandes <sup>3</sup>, Sarah Viana Farias <sup>2</sup>, Natália Harumi Correa Kobayashi <sup>2</sup>, Enéas Andrade Fontes-Junior <sup>2</sup>, Samira G. Ferreira <sup>4</sup>, Rodrigo A. Cunha <sup>4,5</sup>, Rui Daniel Prediger <sup>6</sup> and Cristiane do Socorro Ferraz Maia <sup>1,2,3,\*</sup>

- <sup>1</sup> Neurosciences and Cellular Biology Post Graduation Program, Biological Sciences Institute, Federal University of Pará, Belém 66075-110, PA, Brazil
- <sup>2</sup> Behavioral and Inflammatory Pharmacology Laboratory, Health Sciences Institute, Pharmacy College, Federal University of Pará, Belém 66075-110, PA, Brazil
- <sup>3</sup> Physiological and Morphological Sciences Department, Biological and Health Science Centre, State University of Pará, Belém 66075-540, PA, Brazil
- <sup>4</sup> CNC-Center for Neurosciences and Cell Biology, University of Coimbra, 3004-504 Coimbra, Portugal
- <sup>5</sup> Faculty of Medicine, University of Coimbra, 3004-531 Coimbra, Portugal
- <sup>6</sup> Department of Pharmacology, Centre of Biological Science, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis 88040-900, SC, Brazil
- <sup>7</sup> Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Comportamento, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Pará, Rua Augusto Correa 1, Belém 66075-900, PA, Brazil
- \* Correspondence: cristianafmaia@ufpa.br



**Citation:** Pinheiro, B.G.; Luz, D.A.; Cartágenes, S.d.C.; Fernandes, L.d.M.P.; Farias, S.V.; Kobayashi, N.H.C.; Fontes-Junior, E.A.; Ferreira, S.G.; Cunha, R.A.; Prediger, R.D.; et al. The Role of the Adenosine System on Emotional and Cognitive Disturbances Induced by Ethanol Binge Drinking in the Immature Brain and the Beneficial Effects of Caffeine. *Pharmaceuticals* **2022**, *15*, 1323. <https://doi.org/10.3390/ph15111323>

Academic Editors: Celia Cabral and Ekay Endogan Oltun

Received: 7 September 2022

Accepted: 28 September 2022

Published: 26 October 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** Binge drinking intake is the most common pattern of ethanol consumption by adolescents, which elicits emotional disturbances, mainly anxiety and depressive symptoms, as well as cognitive alterations. Ethanol exposure may act on the adenosine neuromodulation system by increasing adenosine levels, consequently increasing the activation of adenosine receptors in the brain. The adenosine modulation system is involved in the control of mood and memory behavior. However, there is a gap in the knowledge about the exact mechanisms related to ethanol exposure's hazardous effects on the immature brain (i.e., during adolescence) and the role of the adenosine system thereupon. The present review attempts to provide a comprehensive picture of the role of the adenosinergic system on emotional and cognitive disturbances induced by ethanol during adolescence, exploring the potential benefits of caffeine administration in view of its action as a non-selective antagonist of adenosine receptors.

**Keywords:** ethanol; binge drinking; adolescence; adenosine; caffeine

## 1. Introduction

Ethanol is the most commonly used drug by adolescents, mainly consumed through a binge drinking pattern. According to the National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism (NIAAA), binge drinking consumption is characterized by approximately 0.08% grams of alcohol/dL, which corresponds to the intake of four drinks for women and five drinks for men during 2 h [1]. Evidence from human and laboratory animal studies highlighted the profound structural and functional neurodevelopment processes modifying synaptic plasticity and dendritic connectivity during adolescence [2]. This on-going neuronal maturation predisposes the central nervous system (CNS) to harmful consequences of drugs (i.e., ethanol), eliciting anxiety and depressive symptoms as well as cognitive deficits [3–5]. These ethanol-induced behavioral changes in adolescents result from disturbances in homeostasis of several brain regions, such as the prefrontal cortex, hippocampus,



## ANEXO C – autorização comitê de ética



**UFPA**  
Universidade Federal do Pará

**Comissão de Ética no  
Uso de Animais**

Belém, 29 de agosto de 2022  
CEUA N 8324250716  
(ID 001185)

Ilmo(a). Sr(a).  
Responsável: Cristiane Do Socorro Ferraz Maia  
Área: Farmácia

Título da proposta: "Investigação dos efeitos da cafeína sobre as alterações comportamentais e no estresse oxidativo causados pela intoxicação por etanol em padrão binge em ratas nas diferentes fases de desenvolvimento."

**CERTIFICADO (Relatório Final versão de 16/maio/2022)**

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Pará, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** o Relatório Final (versão de 16/maio/2022) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "1. Os objetivos propostos foram todos cumpridos? Resp: SIM Os resultados obtidos propiciaram a criação de novos projetos? Resp: SIM 2. O N amostral proposto inicialmente foi suficiente? Resp: SIM 3. Houve perdas? se sim, quantas? Resp: 10 ANIMAIS 4. Ocorreu algum evento adverso durante a condução do estudo? Resp: N?O 5. Resultados j? apresentados em congresso? Resp: SIM 6. Resultados j? publicados? Resp: N?O".

*Comentário da CEUA: Projeto desenvolvido de acordo com objetivos e metodologias propostas. A pesquisadora relata perda de 10 animais. Os resultados obtidos já foram apresentados em evento científico. Dados ainda não publicados.*

Profa. Dra. Barbarella de Matos Macchi  
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal do Pará

Profa. Dra. Maria Vivina Barros Monteiro  
Vice-Cordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal do Pará

