



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

LUANNA DE MELO PEREIRA FERNANDES

Caracterização dos efeitos comportamentais, teciduais e bioquímicos da administração
intermitente e episódica de EtOH em ratas da adolescência à fase adulta

BELÉM

2016

LUANNA DE MELO PEREIRA FERNANDES

Caracterização dos efeitos comportamentais, teciduais e bioquímicos da administração intermitente e episódica de EtOH em ratas da adolescência à fase adulta

Tese de Doutorado submetida à coordenação do Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará – UFPA como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Neurociências e Biologia Celular – área de concentração em Neurociências.

Orientadora: Profa. Dra. Cristiane do Socorro Ferraz Maia

BELÉM

2016

Dados Internacionais de Catalogação- na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFPA

Fernandes, Luanna de Melo Pereira, 1989-

Caracterização dos efeitos comportamentais, teciduais e bioquímicos da administração intermitente e episódica de EtOH em ratas da adolescência à fase adulta / Luanna de Melo Pereira Fernandes; Orientadora, Cristiane do Socorro Ferraz Maia. - 2016.

Inclui bibliografia

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, Belém, 2016.

1. Adolescentes (meninas) – uso de álcool. 2. Álcool – efeito fisiológico. 3. Capacidade motora. 4. Memória de curto prazo. I. Maia, Cristiane do Socorro Ferraz, orientadora. II. Título.

CDD – 22 ed. 613.81

LUANNA DE MELO PEREIRA FERNANDES

Caracterização dos efeitos comportamentais, teciduais e bioquímicos da administração intermitente e episódica de EtOH em ratas da adolescência à fase adulta

Tese de Doutorado submetida à coordenação do Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará – UFPA como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Neurociências e Biologia Celular – área de concentração em Neurociências.

Data: 18 de Outubro de 2016

Orientação:

Profa. Dra. Cristiane do Socorro Ferraz Maia – Orientadora

Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Comportamento – ICS – UFPA

Banca examinadora:

Prof. Dr. Rui Daniel Prediger – Membro externo

Laboratório Experimental de Doenças Neurodegenerativas – CCB – UFSC

Prof. Dr. Rafael Rodrigues Lima – Membro interno

Laboratório de Biologia Estrutural e Funcional – ICB – UFPA

Prof. Dr. Enéas de Andrade Fontes Júnior – Membro externo

Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Comportamento – ICS – UFPA

DEDICATÓRIA

Este trabalho é dedicado a Ana Célia que, com muitas lutas, criou-me sendo pai e mãe ao mesmo tempo e trazendo sempre a memória de meu pai Carlos que, mesmo indo tão cedo, deixou muito do que há em mim, inclusive minhas escolhas profissionais. Não tem como não dedicar esse trabalho também ao meu esposo Antonio que sempre está ao meu lado, apoiando-me.

AGRADECIMENTOS

À Deus, que é minha fonte de inspiração diária, em tudo que faço, sem Ele nada seria possível só tenho a agradecê-lo pelas grandes bênçãos em minha vida.

À minha mãe pelo apoio, amor, dedicação e incentivo ao longo da minha vida. Por ter me fornecido toda a base necessária para que eu conseguisse lutar por meus objetivos. Por sempre acreditar e confiar em mim, qualquer que fosse minha decisão.

Ao meu esposo que sempre me incentivou e entendeu minhas ausências quando tinha que “sacrificar” feriados e finais de semana, inclusive, participou de muitos desses momentos com apoio. Tenho sorte de poder contar com tamanha cumplicidade, entendimento, carinho, além de todo companheirismo.

A Mariana, mesmo distante, você é fundamental em minha vida! Minha querida irmã!

À orientadora, Dra. Cristiane do Socorro Ferraz Maia, muito obrigada pelo incentivo em todos os momentos, pelas horas de trabalho sempre produtivas. Aprendo demais com você.

Ao Prof. Dr. Enéas Fontes Júnior por tamanha sabedoria e paciência nos conselhos acadêmicos prestados, além de ser um grande amigo que levarei para a vida.

Às minhas duas grandes amigas Luana e Sabrina meu muito obrigada pelas horas incessantes de trabalho que participaram comigo. Vocês são pessoas fundamentais para a realização deste trabalho e muitos virão com nossas futuras parcerias acadêmicas, acredito nisso, no potencial de vocês e na carreira linda que estão construindo.

Aos mestres Aline, Cíntia e Antonio Cerasi pela amizade, boa convivência, gargalhadas, torcida e grande incentivo.

A todos os colegas de laboratório especialmente aos alunos: Klaylton, Mallone, Diandra, Paula, Mayara. Meninos, vocês não imaginam quanto tenho orgulho de vocês e torço muito que alcem voos cada vez mais altos! Obrigado pela dedicação nas inúmeras manhãs ou noites ou madrugadas, mesmo aos finais de semana e feriados. Esse trabalho também é mérito de vocês.

À amiga mestre Nair Castro e ao coordenador Nelson pelo acesso dado ao Centro de Perícias Científicas Renato Chaves onde foram realizadas as dosagens alcoólicas.

À parceria indispensável do Prof. Dr. Rui Prediger e sua aluna Marissa pelo apoio na execução do ensaio de *Western blot*, assim como, às discussões científicas sempre muito produtivas.

À parceria da Profa. Dra. Marta Chagas e seu aluno Rafael Quadros pelo apoio na execução dos ensaios de estresse oxidativo.

À Universidade Federal do Pará pela grande oportunidade de realização das etapas mais importantes da minha vida, desde a graduação.

Ao Biotério Central da Universidade Federal do Pará, por fornecer os animais utilizados nesta pesquisa especialmente aos parceiros Reginaldo e Amarildo.

Ao programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular pela oportunidade de realizar este estudo.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro durante o doutoramento.

“Mas, como está escrito: As coisas que o olho não viu, e o ouvido não ouviu, e não subiram ao coração do homem, são as que Deus preparou para os que o amam”.
(1 Coríntios 2:9)

RESUMO

O consumo do etanol (EtOH) tem aumentado principalmente no público feminino adolescente. A ingestão de EtOH na forma intermitente e episódica possui frequência de consumo em torno de 3 vezes por semana. Os efeitos tóxicos dessa forma de consumo são especialmente perigosos em detrimento ao consumo contínuo de EtOH devido às altas doses ingeridas seguidas de abstinência, acarretando maiores alterações no sistema nervoso central (SNC) em maturação em pouco tempo de consumo. Considerando a relevância epidemiológica e as consequências nocivas do EtOH sobre o balanço oxidativo, produção hormonal e de neurotrofina no SNC em maturação, o objetivo deste estudo foi investigar as respostas comportamentais, teciduais e bioquímicas derivadas do consumo intermitente e episódico de EtOH em ratas na fase de adolescência à idade adulta. Ratos *Wistar* fêmeas adolescentes (n=80) receberam, por gavagem, água destilada ou EtOH (3 g/kg/dia) durante 3 dias consecutivos por semana. Os animais foram avaliados sete horas e meia após o último dia de administração em 1, 4 e 8 semanas de episódios de *binge drinking* (37, 58 e 86 DPN, respectivamente), além disso, foi adicionado um período de 14 dias de abstinência após 8 BD (100 DPN) a fim de avaliar a habilidade do SNC em reverter danos gerados sobre ele. A bateria de testes comportamentais foi constituída de atividade locomotora espontânea, reconhecimento de objetos, labirinto em cruz elevado, *pole test*, *beam walking* e rotarod. Os animais foram sacrificados e as amostras de sangue coletadas para avaliação dos níveis de corticosterona, de malondialdeído, atividade da catalase, atividade da superóxido-dismutase e conteúdo de glutatona. Por conseguinte, o hipocampo foi dissecado para quantificação do imunoconteúdo de BDNF. A administração de EtOH alcançou concentração sanguínea média de 197,4 mg/dL e no período de 7,5 horas após a última administração de EtOH em *binge* agudo, a concentração sanguínea foi de 0,7 mg/dL. Dessa forma, os animais realizaram os ensaios comportamentais pós-consumo de EtOH, não sob efeito da droga. O consumo de EtOH em *binge* não alterou o ganho de peso dos animais da adolescência à vida adulta, no entanto, reduziu a atividade locomotora exploratória, prejuízo na coordenação motora, equilíbrio e aprendizado motor associado à bradicinesia, assim como, prejuízo no processo mnemônico e aumento do comportamento relacionado à ansiedade. Estes prejuízos foram acompanhados de elevação hormonal de corticosterona, redução dos níveis de BDNF hipocampal e desequilíbrio no balanço oxidativo sistêmico. Dessa forma, foi possível identificar que os prejuízos encontrados sobre o comportamento semelhante à ansiedade, memória de curta duração, bradicinesia e atividade locomotora espontânea apareceram desde o pós-consumo de EtOH por três dias

consecutivos, no entanto, não apresentaram recuperação nem piora do dano após repetidos episódios. Em contrapartida, houve recuperação da memória de curta duração na tarefa de reconhecimento do objeto associado ao retorno dos níveis normais de BDNF na idade adulta. Além disso, demonstrou piora no aprendizado motor na fase adulto jovem seguido de recuperação gradual e parcial após período prolongado de retirada da droga, mesmo assim, o prejuízo da coordenação motora e equilíbrio permaneceram na fase adulta.

Palavras-chave: adolescente, atividade motora, beber em *binge*, etanol, memória de curta duração.

ABSTRACT

The consumption of ethanol (EtOH) is enhanced particularly in adolescent female pubic. The EtOH intake and intermittent episodic own consumption rate around 3 times per week. The toxic effects of this kind of consumption is especially dangerous over the continuous consumption of EtOH followed due to the high dietary intakes of abstinence, causing major changes in the central nervous system (CNS) maturing in a short time consumption. Considering the epidemiological relevance and the harmful effects of EtOH on the oxidative balance, hormone production and neurotrophin CNS maturing, the aim of this study was to investigate the behavioural, tissue and biochemical responses derived from intermittent and episodic consumption of EtOH in rats in phase from adolescence to adulthood. Wistar female adolescents (n = 80) received by gavage, distilled water or EtOH (3 g/kg/day) for 3 consecutive days per week. The animals were assessed seven and a half hours after the last administration day 1, 4 and 8 weeks of episodes of binge drinking (37, 58 and 86 DPN, respectively), besides, a period of 14 days of abstinence was added after BD 8 (100 DPN) to evaluate the ability to reverse the CNS damage generated on it. The battery of behavioural tests consisted of spontaneous locomotor activity, object recognition, elevated plus maze, test pole, walking beam and rotarod. The animals were sacrificed and blood samples collected for evaluation of corticosterone levels of malondialdehyde, catalase activity, the activity of superoxide dismutase and glutathione content. Therefore, the hippocampus was dissected to quantify the immunocontent BDNF. The administration of EtOH reached average peak blood concentration of 197.4 mg / dL and the period of 7.5 hours after the last administration EtOH in acute binge blood concentration was 0.7 mg / dL. Thus, the animals underwent behavioural tests post-consumer EtOH, not under the drug effect. Consumption of EtOH in binge did not affect weight gain of adolescent animals into adulthood, however, reduced the exploratory locomotor activity, impaired motor coordination, balance and motor learning associated with bradykinesia, as well as loss in the mnemonic process and increased anxiety-like behaviour. These losses were accompanied by hormonal elevation of corticosterone, reduced hippocampal BDNF levels and systemic imbalance in the oxidative balance. Thus, it was possible to identify that the damage found on the similar behaviour to anxiety, short-term memory, bradykinesia and spontaneous locomotor activity appeared from EtOH post-consumption for three consecutive days, however, they showed no recovery or worsening of damage after repeated episodes. In contrast, there was recovery of short-term memory in object recognition task associated with the return of normal levels of BDNF in adulthood. Moreover, it showed worsening in motor

learning in young adult phase followed by gradual and partial recovery after prolonged period of drug withdrawal, yet the loss of motor coordination and balance remained in adulthood.

Key words: adolescence, binge drinking, ethanol, motor activity, ethanol, short-term memory.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Registro do consumo de EtOH na forma de <i>binge</i> , no Brasil. 2006 – 2012.....	34
Figura 2	Metabolismo do EtOH.....	36
Figura 3	Esquema do tratamento experimental com EtOH na forma de <i>binge drinking</i> ..	51
Figura 4	Arena utilizada no teste do campo aberto.....	53
Figura 5	Ilustração do <i>pole test</i>	54
Figura 6	Desenho esquemático do beam walking test (BWT).....	55
Figura 7	Ilustração do rotarod.....	57
Figura 8	Diagrama esquemático do aparato do labirinto em cruz elevado (LCE).....	58
Figura 9	Ilustração do reconhecimento de objeto.....	60
Figura 10	Delineamento experimental do estudo.....	61
Figura 11	Efeitos da administração de etanol (EtOH) em forma de <i>binge drinking</i> sobre o ganho de peso de ratas na fase de adolescência à fase adulta.....	69
Figura 12	Dosagem da concentração de etanol (EtOH) em forma de <i>binge drinking</i> (3 dias consecutivos) no sangue de ratas na fase de adolescência.....	70
Figura 13	Efeitos da administração de etanol (EtOH) em forma de <i>binge drinking</i> sobre a atividade locomotora espontânea de ratas na fase de adolescência à fase adulta por meio dos parâmetros distância total percorrida (painel A) e número de levantamentos exploratórios (painel B).....	71
Figura 14	Efeitos da administração de etanol (EtOH) em forma de <i>binge drinking</i> na determinação do controle de movimento e avaliação do desenvolvimento de bradicinesia em ratas na fase de adolescência à fase adulta por meio da média dos 3 melhores ensaios no tempo de descida em segundos até a base da plataforma.....	72
Figura 15	Efeitos da administração de etanol (EtOH) em forma de <i>binge drinking</i> sobre o número de escorregadas de ratas na fase de adolescência à fase adulta ao atravessar vigas graduadas.....	76
Figura 16	Efeitos da administração de etanol (EtOH) em forma de <i>binge drinking</i> sobre a coordenação motora de ratas na fase de adolescência à idade adulta avaliadas pelo tempo de permanência sobre o cilindro giratório no teste do rotarod.....	78

Figura 17	Efeitos da administração de etanol (EtOH) em forma de <i>binge drinking</i> sobre o comportamento semelhante à ansiedade de ratas na fase de adolescência à idade adulta avaliado por meio distância percorrida na área central no teste do campo aberto (painel A) e percentual de entrada nos braços abertos (%EBA) no teste do labirinto em cruz elevado (LCE-painel C).....	80
Figura 18	Efeitos do etanol (EtOH) em forma de <i>binge drinking</i> sobre o padrão de exploração de ratos Wistar fêmeas na fase de adolescência à idade adulta no aparato do campo aberto avaliado pelo tempo de imobilidade (painel A) e ocupação por grupo dos animais (marcação no centro do animal no software Anymaze) durante o período de teste (painel B).....	81
Figura 19	Efeitos da administração de etanol (EtOH) em forma de <i>binge drinking</i> sobre a memória de curta duração de ratas na fase de adolescência à idade adulta avaliadas no teste de reconhecimento do objeto.....	84
Figura 20	Efeitos da administração de etanol (EtOH) em forma de <i>binge drinking</i> sobre os níveis de corticosterona (CORT) do soro de ratas na fase de adolescência à idade adulta.....	85
Figura 21	Efeito da administração de etanol (EtOH) em forma de <i>binge drinking</i> sobre a quantidade de imunocontéudo de BDNF no hipocampo de ratas na fase de adolescência à idade adulta por meio do método de <i>Western blot</i>	86
Figura 22	Correlação da quantidade de imunocontéudo de BDNF no hipocampo e valores do índice de discriminação da tarefa de reconhecimento de objeto de ratas após o consumo de etanol (EtOH) em forma de <i>binge drinking</i> na fase de adolescência à idade adulta.....	87
Figura 23	Efeitos da administração de etanol (EtOH) em forma de <i>binge drinking</i> sobre o balanço oxidativo de ratas na fase de adolescência à idade adulta por meio do percentual do controle da concentração de malondialdeído (MDA, painel A) e dos percentuais do controle das atividades enzimáticas de catalase (painel B) e superóxido-dismutase (SOD, painel C).....	89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Padrão de bebida em gramas de etanol (EtOH) - <i>Standard drink</i> - em diferentes países.....	32
Tabela 2	Distribuição dos grupos experimentais, descrição e quantidade de animais por grupo.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HT3	Receptor tipo 3 da 5-Hidroxi-Triptamina (Serotonina)
BWT	<i>Beam walking test</i>
Ca ²⁺	Íon cálcio
DPN	Dia pós-natal
HPA	Eixo hipotálamo-pituitária-adrenal
CRF	<i>Corticotropin-releasing factor</i>
ACTH	<i>Adrenocorticotropic hormone</i>
CORT	Corticosterona
ADH	Álcool desidrogenase
ALDH	Aldeído desidrogenase
EROS	Espécies reativas de oxigênio
SOD	Superóxido dismutase
MDA	Malondialdeído
BDNF	<i>Brain-derived neurotrophic factor</i>
COX-2	Ciclooxigenase-2
PGR	Peso glandular relativo
HE	Hematoxilina e eosina
BD	<i>Binge drinking</i>
EBA	Entradas nos braços abertos
EBF	Entradas nos braços fechados
TBA	Ácido tiobarbitúrico
e.p.m	Erro padrão da média
EtOH	Etanol
EUA	Estados Unidos da América
GABA	Ácido gama-aminobutírico
Glu	Glutamato
GlyR	Receptor de glicina

H ₂ O _{dest.}	Água destilada
ICAP	<i>International Center for Alcohol Policies</i> (Centro Internacional de Políticas de Álcool)
iGluR	Receptor ionotrópico de glutamato
K ⁺	Íon potássio
LCE	Labirinto em cruz elevado
LENAD	Levantamento Nacional de Álcool e Drogas
OMS	Organização Mundial de Saúde
SNC	Sistema Nervoso Central

SUMÁRIO

1. MEMORIAL	20
2. INTRODUÇÃO	27
2.1 Cronologia da adolescência	28
2.2 Maturação na adolescência	28
2.3 Prevalência do consumo do álcool na adolescência	30
2.4 Álcool como fator de risco na adolescência	35
2.4.1 FARMACOCINÉTICA DO ÁLCOOL.....	35
2.4.2 EFEITOS DO ETOH SOBRE OS PROCESSOS FISIOLÓGICOS.....	36
2.4.2.1 ESTRESSE OXIDATIVO.....	36
2.4.2.2 TOXICIDADE SOBRE O SNC.....	37
3. JUSTIFICATIVA	44
4. OBJETIVOS	46
4.1 Objetivo geral	46
4.2 Objetivos específicos	46
5 METODOLOGIA	46
5.1 Animais e grupos experimentais	48
5.2 Tratamento com EtOH	49
5.3 Dosagem da concentração alcoólica sanguínea	51
5.4 Ensaios comportamentais	51
5.4.1 ESTUDO DOS EFEITOS DO ETOH SOBRE O COMPORTAMENTO MOTOR.....	52
5.4.1.1 TESTE DA ATIVIDADE LOCOMOTORA ESPONTÂNEA/ CAMPO ABERTO (OPEN FIELD).....	52
5.4.1.2 TESTE DE DESCIDA EM VIGA VERTICAL (<i>POLE TEST</i>).....	53
5.4.1.3 TESTE DE EQUILÍBRIO EM VIGAS GRADUADAS (<i>BEAM WALKING TEST- BWT</i>).....	55
5.4.1.4 TESTE DE LOCOMOÇÃO FORÇADA EM CILINDRO GIRATÓRIO (TESTE DO ROTAROD).....	56
5.4.2 ESTUDO DOS EFEITOS DO ETOH SOBRE O COMPORTAMENTO RELACIONADO À ANSIEDADE E MEMÓRIA.....	57
5.4.2.1 TESTE DA ATIVIDADE LOCOMOTORA ESPONTÂNEA/ CAMPO ABERTO (<i>OPEN FIELD</i>).....	57
5.4.2.2 TESTE DO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO (LCE).....	58

5.4.2.3 TAREFA DE RECONHECIMENTO DE OBJETO.....	60
5.5 Ensaio bioquímicos.....	62
5.5.1 COLETA DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS.....	62
5.5.2 DOSAGEM DOS NÍVEIS DE CORTICOSTERONA (CORT) SANGUÍNEO.....	62
5.5.3 ENSAIO DE IMUNODETECÇÃO DE BDNF HIPOCAMPAL POR MEIO DO MÉTODO DE <i>WESTERN BLOT</i>	63
5.5.3.1 PREPARAÇÃO DO HOMOGENADO.....	63
5.5.3.2 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS.....	63
5.5.3.3 ENSAIO DE IMUNODETECÇÃO POR MEIO DO MÉTODO DE <i>WESTERN BLOT</i>	63
5.5.4 AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO.....	64
5.5.4.1 DOSAGEM DE MALONDIALDEÍDO (MDA).....	64
5.5.4.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA CATALASE.....	65
5.5.4.3 DOSAGEM DE PROTEÍNAS TOTAIS NO HEMOLISADO.....	65
5.5.4.4. DOSAGEM DE ATIVIDADE DA ENZIMA SUPERÓXIDO-DISMUTASE (SOD).....	66
5.6 Análise estatística.....	67
6 RESULTADOS.....	69
6.1 Repetidos episódios da administração intermitente de EtOH (3 g/kg/dia) não altera o peso corporal de ratas da adolescência à fase adulta.....	69
6.2 Concentração de EtOH sanguíneo após repetidos episódios de <i>binge drinking</i> por 3 dias consecutivos na fase de adolescência.....	69
6.3 Efeitos após a administração de EtOH no padrão <i>binge</i> da adolescência à fase adulta sobre o comportamento motor.....	70
6.3.1 ADMINISTRAÇÃO DE ETOH NO PADRÃO <i>BINGE</i> PROVOCA REDUÇÃO DA ATIVIDADE LOCOMOTORA ESPONTÂNEA EM RATAS POR TEMPO PROLONGADO.....	70
6.3.2 ETOH NO PADRÃO <i>BINGE</i> GERA OCORRÊNCIA DE BRADICINESIA EM RATAS DA ADOLESCÊNCIA À IDADE ADULTA.....	72
6.3.3 ADMINISTRAÇÃO DE ETOH NO PADRÃO <i>BINGE</i> GERA PREJUÍZO NA COORDENAÇÃO MOTORA E EQUILÍBRIO DE RATAS POR TEMPO PROLONGADO.....	73

6.4 Repetidos episódios de <i>binge drinking</i> da adolescência à fase adulta geram comportamento semelhante à ansiedade.....	78
6.5 <i>Binge drinking</i> durante a adolescência à fase adulta provoca prejuízo temporário na memória de curta duração na tarefa de reconhecimento de objeto.....	82
6.6 Efeitos bioquímicos após administração em <i>binge drinking</i> durante a adolescência à fase adulta de ratas.....	84
6.6.1 REPETIDOS EPISÓDIOS DE ETOH GERA AUMENTO DOS NÍVEIS DE CORT DESDE A ADOLESCÊNCIA À FASE ADULTA.....	84
6.6.2 ETOH INTERMITENTE E EPISÓDICO PROVOCA ALTERAÇÃO DA QUANTIDADE DE IMUNOCONTEÚDO DE BDNF NO HIPOCAMPO.....	85
6.6.3 CORRELAÇÃO ENTRE IMUNOCONTEÚDO DE BDNF NO HIPOCAMPO E ÍNDICE DE DISCRIMINAÇÃO NA TAREFA DE RECONHECIMENTO DE OBJETO...86	
6.6.4 ADMINISTRAÇÃO DE <i>BINGE DRINKING</i> PRODUZ DESEQUILÍBRIO NO BALANÇO OXIDATIVO DE RATAS DA ADOLESCÊNCIA À IDADE ADULTA.....	87
7 DISCUSSÃO.....	91
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	110
9 REFERÊNCIAS.....	112
10 ANEXOS.....	133
ANEXO A – Artigo científico publicado.....	133
ANEXO B – Apreciação do Comitê de Ética.....	143

I MEMORIAL

1. MEMORIAL

Iniciei minhas atividades científicas ainda durante a graduação, em 2009, como bolsista de iniciação científica no projeto submetido e aprovado pela agência de fomento FAPESPA, intitulado: “Efeitos neurocomportamentais, neuroprotetores e na recuperação funcional após bloqueio da ativação microglial com minociclina em ratos submetidos à isquemia focal no córtex motor quando tratados cronicamente com EtOH da adolescência à fase adulta” cuja coordenadora do projeto foi a Profa Dra Cristiane do Socorro Ferraz Maia.

O projeto inicial foi oriundo da parceria de dois principais laboratórios colaboradores e professores envolvidos: Prof. Rafael Rodrigues Lima e Prof. Wallace Gomes Leal do Laboratório de Neuroproteção e Neuroregeneração Experimental do Instituto de Ciências Biológicas- UFPA e Profa. Cristiane do Socorro Ferraz Maia do Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Comportamento do Instituto de Ciências da Saúde- UFPA. A parceria resultou em publicações em revistas científicas internacionais, além da ampliação das parcerias envolvidas com adição de outros importantes colaboradores (Profa Elena Crespo López- ICB, UFPA; Profa Marta Chagas- ICS, UFPA e Prof Rui Daniel Prediger- CCB, UFSC) e consolidação efetiva do grupo de pesquisa o qual faço parte.

Inicialmente, o grupo propôs avaliar a interação entre a intoxicação alcoólica crônica iniciada na adolescência e o acidente vascular encefálico isquêmico em córtex motor na fase adulta em ratos fêmeas, e os efeitos do tratamento com minociclina sobre esta interação, utilizando-se parâmetros comportamentais, celulares e moleculares. Dessa forma, a amplitude do projeto inicial culminou em defesas de trabalho de conclusão de curso, mestrado e doutorado e duas publicações em revistas de alto fator de impacto e relevância na comunidade científica.

Dentre os principais resultados encontrados a respeito da interação entre intoxicação crônica com etanol (EtOH) e o dano isquêmico no córtex motor de ratos fêmeas foram marcantes distúrbios motores como redução da atividade locomotora espontânea, perda da força muscular, coordenação motora e equilíbrio em diferentes tarefas comportamentais resultando em importantes alterações teciduais e perda neuronal grave. Assim como, também foi encontrado que a intoxicação alcoólica crônica limita a ativação microglial e astrocitária desencadeada pelo processo isquêmico, mas desenvolve um potente sinergismo sobre marcadores de estresse oxidativo (OLIVEIRA et al., 2014; FONTES-JÚNIOR et al., 2016).

A respeito da ação terapêutica da minociclina nas condições de intoxicação alcoólica crônica e isquemia, foi evidenciado efetividade da minociclina na prevenção das perdas motoras e celulares induzidas pela isquemia cortical. Assim como, o tratamento com a minociclina após a intoxicação crônica com EtOH da adolescência à fase adulta foi capaz de reverter déficits

motores induzidos pela isquemia cerebral focal, associada a uma preservação neuronal significativa e diminuição da ativação microglial exacerbada (OLIVEIRA et al., 2014; FONTES-JÚNIOR et al., 2016).

No entanto, avaliação mais minuciosa da função motora por Fontes-Júnior e colaboradores (2016) revelou que, como a comorbidade agravou significativamente as alterações comportamentais, os animais intoxicados com EtOH e com o córtex motor isquemiado, mesmo após tratamento com minociclina, apresentaram perdas na capacidade de iniciar movimentos e na exploração vertical. Dessa forma, foi possível sugerir que ajustes na terapêutica da minociclina sejam necessários no tratamento da isquemia em pacientes etilistas.

A partir da relevância dos resultados encontrados nos grupos EtOH-intoxicados e devido à gama de mecanismos envolvidos nos efeitos neurotóxicos do álcool e diversas áreas afetadas pela administração desta droga, nosso grupo de pesquisa iniciou investigações a respeito dos efeitos do EtOH per se sobre funções motoras, comportamento relacionado à ansiedade, processo mnemônico e suas respectivas áreas encefálicas responsáveis.

Vale ressaltar que o modelo de intoxicação alcoólica utilizada em nossa linha de pesquisa consistiu de uma forma pesada de consumo contínuo crônico – conhecido como *heavy drinking*- iniciado na adolescência seguido até a idade adulta. Este modelo geralmente está associado ao consumo frequente de 5 doses padrão de EtOH ou mais e tem sido relacionado com a desordem clínica do etilismo que é caracterizado pelo consumo compulsivo do álcool com desenvolvimento de tolerância e dependência (POMBO et al., 2015; NIAAA, 2016). Além disso, nosso modelo experimental tem sido utilizado com fêmeas a fim de elucidar os efeitos da administração do álcool sobre a população feminina que tem aumentado o consumo de EtOH (INPAD, 2013). Assim, este modelo reflete o padrão de abuso do consumo de EtOH na população humana (NIAAA, 2004; SKALA e WALTER, 2013; WHO, 2014).

Ao investigar se a exposição pesada e crônica de EtOH durante a adolescência até a idade adulta de ratos fêmeas pode induzir danos histológicos do hipocampo e deficiências neurocomportamentais, nosso grupo de pesquisa encontrou, pela primeira vez, danos funcionais e morfológicos duradouros no hipocampo observado na vida adulta. Além disso, a administração crônica de EtOH induziu comportamento relacionado à ansiedade e comprometimento da memória de curto prazo avaliada pelos testes de reconhecimento social e esquivia inibitória acompanhados por redução no volume do hipocampo e alteração morfológica nas regiões hipocampais de CA1, CA3 e hilo e perda neuronal sem demonstrar, no entanto, o

envolvimento de marcadores do estresse oxidativo nas alterações comportamentais e morfológicas induzidas pelo EtOH no protocolo utilizado (OLIVEIRA et al., 2015).

Paralelamente, nosso grupo também buscou investigar se o protocolo de administração crônica de EtOH durante a adolescência pode induzir deficiências motoras e danos histológicos no córtex cerebral e cerebelo de ratos fêmeas, assim como, foi avaliado o suposto envolvimento dos mecanismos neuroinflamatórios e de estresse oxidativo. Apesar dessas avaliações, foi encontrado, pela primeira vez, que a intoxicação crônica e pesada de EtOH induz dano motor em longo prazo avaliado por diferentes ensaios comportamentais- campo aberto, plano inclinado e rotarod- que foram acompanhados por perda neuronal e de células gliais do córtex cerebral (TEIXEIRA et al., 2014) e cerebelo de ratos fêmeas (dados ainda não publicados). Além disso, os ensaios bioquímicos revelaram um papel principal para o estresse oxidativo, e especialmente para a via nitrérgica nos efeitos corticais observados (TEIXEIRA et al., 2014).

De outra maneira, além das investigações a respeito da intoxicação crônica do EtOH na forma de consumo pesado da adolescência à idade adulta de ratos *Wistar* fêmeas com repercussões em áreas do sistema nervoso central (SNC) e reflexos no comportamento, investigamos os efeitos desta droga sobre o aparelho estomatognático pois percebemos a lacuna na literatura acerca das repercussões na cavidade oral provocadas por este protocolo de consumo de EtOH.

Dessa forma, nosso grupo de pesquisa realizou estudos a respeito dos prejuízos do EtOH crônico no modelo de *heavy drinking* (altas doses de EtOH, 6,5 g/kg/dia) da adolescência à idade adulta de ratos *Wistar* fêmeas sobre importante processo fisiológico no tecido periodontal, no qual foi encontrada alteração da homeostase da cavidade oral deflagrada pela perda óssea alveolar (BANNACH et al., 2015).

Porém, observamos que haviam poucas investigações na literatura a respeito dos danos encontrados no tecido glandular. Então, este estudo inclui os efeitos sobre as alterações em glândulas salivares de ratos fêmeas decorrentes do consumo contínuo de EtOH no modelo *heavy drinking* da adolescência à idade adulta (ANEXO A). Dessa forma, foram encontrados atrofia no parênquima glandular associada ao aumento do peso da parótida com redução da população celular ductal e mioepitelial; além disso, foi identificadas mudanças na população celular da glândula submandibular com aparecimento de estruturas ductiformes e aumento de apoptose no local (FERNANDES et al., 2015).

Estudos têm demonstrado que o consumo de EtOH afeta glândulas salivares gerando redução do fluxo salivar relacionado à atrofia do parênquima secretor glandular (MAIER et al., 1990; BANDERAS et al., 1992; RIEDEL et al., 2003; CARRANZA et al., 2005). No entanto,

o efeito do consumo de álcool sobre o tamanho da glândula permanece incerto (MANDEL e BAURMASH, 1971; MAIER et al., 1986; SCOTT et al., 1988; CAMPOS et al., 2005; MANDEL et al., 2005). A intoxicação com EtOH no protocolo de *heavy drinking* utilizado neste estudo gerou aumento somente da glândula parótida.

Os efeitos do consumo de EtOH no padrão *heavy drinking* sobre a nutrição são bem conhecidos e podem contribuir para o deficiente desenvolvimento dos órgãos (CAMPOS et al., 2005). O estado de mal nutrição em roedores é caracterizado pela disfunção comportamental, perda ou mudanças nos pelos, diarreia, edema e considerável perda de peso (CAMPANA et al., 1975). Estes fatores alteram a fisiologia e morfologia das glândulas salivares (NÖR et al., 2003).

Apesar do protocolo *heavy drinking* utilizado neste estudo, não foi encontrado qualquer característica de mal nutrição nas ratas da adolescência à idade adulta conforme previamente observado por Oliveira et al. (2014) que utilizou o mesmo paradigma de intoxicação. No entanto, nossos achados demonstram atrofia da glândula parótida (observado pela redução da área do parênquima) associado ao aumento do peso glandular conforme reportado por alguns autores (RIEDEL et al., 2003; CAMPOS et al., 2005). A atrofia glandular depende da dose e duração do consumo de EtOH, no entanto, ainda não é conhecido a partir de que momento ocorre esta alteração (SCOTT et al., 1988).

Além do mais, nossos resultados também revelaram que a área do estroma da glândula submandibular aumentou a qual não foi acompanhada de processo inflamatório, haja vista que não foi visualizado infiltrado inflamatório na área aumentada. Entretanto, alguns relatos afirmam que a intoxicação crônica com EtOH aumenta infiltração periductal linfocitária (DALE, 2001; CARDA et al., 2005). De outra maneira, é bem reportado que o alcoolismo crônico é uma das causas da sialodenoze, esta patologia não é de natureza inflamatória, induz alargamento glandular e altera o peso glandular (MANDIY e SURAFFANON, 2002). Estas informações podem explicar parcialmente nossos achados.

Além disso, a atrofia glandular produzida pelo consumo contínuo crônico do álcool está associada ao aumento da atividade proliferativa do epitélio da mucosa oral que pode ser causada por efeito citotóxico do EtOH etanol (RIEDEL et al., 2003). Estudos recentes em ratos demonstram que a intoxicação crônica de EtOH durante a idade adulta associada a parcial remoção da glândula submandibular induz proliferação celular e aumento de ductos convolutos ricos em fatores de crescimento que estão presentes somente na glândula submandibular (AMANO et al., 2012; NOR et al., 2013), no 7º dia pós-cirúrgico. No presente estudo, a intoxicação crônica durante 55 dias aumentou a intensidade de marcação de citoqueratina-19

(CK 19) e aparecimento de estruturas tipo ductal na submandibular, no entanto, redução na marcação parótida após o estímulo nocivo.

Citoqueratinas são proteínas do citoesqueleto de filamentos intermediários específico de células epiteliais (FRADETTE et al., 1998). Estudos prévios afirmam que aumento da marcação de CK 19 pelas células suprabasais da mucosa oral indica disfunção e mudanças de provável pré-malignidade (MICHEL et al., 1996; ZHONG et al., 2007). Todavia, atrofia glandular em longo prazo gera redução de células ductais na glândula parótida (WALKER e GOLBÉ, 1987).

Considerando-se que as células ductais no volume total da submandibular é em torno de 20% comparada a parótida (5%) e que estas células exibem menor susceptibilidade a fatores estressores (isto é, como o consumo de álcool), dessa forma, a glândula submandibular apresenta fatores de resistência em maior proporção (DEHAYE e TURNER, 1991; BURGESS e DARDICK, 1998). No entanto, o presente trabalho não pode fornecer evidência direta para explicar essas alterações ou os mecanismos responsáveis pela alteração glandular.

A imunohistoquímica realizada para identificação de células mioepiteliais revelou redução na intensidade de marcação somente na glândula parótida EtOH-intoxicada. De acordo com estudos que avaliam indução experimental de atrofia ductal por outros mecanismos (como por ligadura), a população de células mioepiteliais reduz após indução de atrofia persistente (BURGESS et al., 1996; BURGESS e DARDICK, 1998). Dessa forma, neste estudo, houve redução da população de células mioepiteliais do parênquima glandular da parótida causada pelo consumo de EtOH no padrão *heavy* durante a adolescência.

Foram encontradas células caspase-3 positiva em ácinos e ductos das glândulas salivares. Está bem descrito que a apoptose participa de processos progressivos e regressivos que ocorrem em períodos do desenvolvimento e de regeneração glandular (TAKAHASHI et al., 2004). Este evento contribui para a deleção de células do túbulo terminal e formação do lúmen de ductos (HECHT et al., 2000; JASKOLL e MELNICK, 1999). Neste estudo, o consumo de EtOH no modelo *heavy drinking* gerou aumento na intensidade de marcação de células apoptóticas na glândula submandibular e inalterado na parótida. No entanto, os mecanismos que induziram maiores níveis de caspase-3 em somente um tipo glandular ainda não são compreendidos.

Campos e colaboradores (2005) reportaram que mecanismos bioquímicos de ambas as glândulas diferem, a glândula parótida possui um mecanismo predominantemente aeróbico enquanto que o metabolismo anaeróbico predomina na submandibular. Tais diferenças podem indicar que os eventos de morte celular na parótida sejam diferentes dos que ocorrem na

submandibular, pois a primeira possui maior suscetibilidade a danos oxidativo e a segunda seja mais susceptível a eventos apoptóticos.

Assim, o consumo pesado de EtOH na forma contínua da adolescência à fase adulta causa atrofia em glândula parótida, mas não em glândula submandibular. Os achados na glândula submandibular foram paradoxos devido o consumo de EtOH no modelo *heavy drinking* gerar o aparecimento de células tipo ductais associado a aumento da marcação de caspase-3. Desta forma, este estudo demonstrou diferenças significantes entre as glândulas parótida e submandibular frente ao estímulo de um estressor crônico. Considerando os mecanismos exatos envolvidos no dano causado na glândula parótida e na capacidade proliferativa de células ductais na submandibular, fazem-se necessários mais estudos sobre estas diferenças causadas pelo consumo crônico e pesado de EtOH no tecido glandular de adolescentes.

Considerando as descobertas iniciais sobre os efeitos derivados do *heavy drinking* da adolescência à idade adulta sobre importantes processos fisiológicos em diferentes tecidos corporais, tais como alteração da homeostase da cavidade oral (BANNACH et al., 2015; FERNANDES et al., 2015) e no sistema nervoso verificado por prejuízos neurocomportamentais bem como danos em populações celulares do tecido encefálico (OLIVEIRA et al., 2014; TEIXEIRA et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2015; FONTES-JÚNIOR et al., 2016), surgiram novas perguntas acerca dos efeitos decorrentes do consumo intermitente e episódico de EtOH, haja vista que este é o modelo de consumo dominante de uso indevido do álcool em adolescentes e adultos jovens (CREGO et al., 2009; CREGO et al., 2010; INPAD, 2013).

Assim, em 2013 foi desenvolvido então em nosso laboratório um modelo de *binge drinking* em diferentes períodos de intoxicação a fim de avaliar a partir de que período do consumo intermitente e episódico ocorrem os prejuízos relacionados ao tecido glandular (FAGUNDES et al., 2016) e sobre às funções comportamentais encontradas em nossos estudos anteriores, assim como, as alterações bioquímicas decorrentes desta intoxicação. Desta forma, o estudo a seguir descreve a caracterização das respostas comportamentais, teciduais e bioquímicas derivadas da administração de EtOH no modelo de *binge drinking* em ratas na fase de adolescência à idade adulta.

II INTRODUÇÃO

2. INTRODUÇÃO

2.1 Cronologia da adolescência

A adolescência é um termo usado para descrever um estágio de transição entre a infância à idade adulta que compreende períodos da adolescência e puberdade, uma vez que estes termos não são mutuamente exclusivos (ARAIN et al., 2013). Tendo em vista que o período da puberdade é referido como as mudanças hormonais que ocorrem na fase inicial da adolescência (KAPLAN, 2004).

Durante esta fase do desenvolvimento, o indivíduo passa por transformações físicas, psicossociais e cognitivas (PICKLES et al., 1998; ARAIN et al., 2013). Além de algumas mudanças comportamentais como tomada de risco, alta exploração, busca pela novidade e interação social que auxiliam o desenvolvimento das habilidades sociais necessárias na vida adulta (GALEF, 1997; STANSFIELD e KIRSTEIN, 2005; CREWS et al., 2007; STANSFIELD e KIRSTEIN, 2007).

A faixa etária em humanos que compreende a fase da adolescência é considerado por alguns autores entre os 12-24 anos de idade (ARAIN et al., 2013; SEMPLE et al., 2013). A adolescência em roedores ainda necessita de um consenso e é definida usando vários fatores indicativos de transição do desenvolvimento de adolescentes humanos, incluindo mudanças nos padrões de comportamento, padrões hormonais e/ou características sexuais primárias (MALDONADO-DEVINCCI et al., 2010).

Segundo Spear (2000) o período que engloba a adolescência em roedores é a faixa entre os 28-42 dias pós-natal (DPN), quando ocorrem mudanças comportamentais nos animais mais jovens em relação aos mais velhos, associadas a picos no crescimento corpóreo, abertura vaginal nas fêmeas e aumento da maturidade espermática nos túbulos seminíferos dos machos. Existem diferenças na maturação do desenvolvimento entre gêneros, os machos tendem a estender o período da adolescência para 55 DPN.

Além disso, alguns pesquisadores têm identificado as categorias da adolescência em roedores como precoce (pré-púberes: 21-34 DPN), média (periadolescência: 34-46 DPN) e tardia (adulto jovem: 46-59 DPN). Vale ressaltar que o aparecimento da puberdade está em torno de 33 e 44 DPN em animais com desmame no período de 21 DPN e maturidade reprodutiva em 59 DPN (TIRELLI et al., 2003).

No entanto, para outros autores, a maturidade do ciclo hormonal está por volta de 28-30 DPN aparecendo mais tarde em ratos machos (60 DPN) [MALDONADO-DEVINCCI et al., 2010] visto que, a fase adulta de roedores propriamente dita inicia em média a partir dos 70 dias

de vida quando não são mais influenciados por processos endócrinos durante desenvolvimento ontogenético (KARL et al., 2003; ACEVEDO et al., 2013).

Apesar de não existir uma resposta simples acerca das comparações de idade entre espécies diferentes, Quinn (2005) descreveu algumas equivalências entre dias de vida de ratos e anos de vida para humanos. A extrapolação descrita varia de acordo com a fase do desenvolvimento, no período da adolescência 10,5 dias de vida de ratos equivale a 1 ano de vida para humanos. De outra forma, na fase adulta 11,8 dias de vida de ratos é proporcional a 1 ano na idade de humanos. Um estudo descrevendo o desenvolvimento do cérebro de roedores e seres humanos relatou que a idade de 35-49 DPN em roedores equivale aos 12-18 anos de idade em humanos. Além disso, a partir de 60 DPN em ratos equivale aos 20 anos ou mais de idade em indivíduos humanos (SEMPLE et al., 2013).

Vale ressaltar que o encéfalo adolescente é um estado de transição em que ocorrem alterações progressivas e regressivas fornecendo uma base biológica para os comportamentos específicos da adolescência, associadas às mudanças no comportamento durante a maturação para a vida adulta (CREWS et al., 2007).

2.2 Maturação na adolescência

Durante a infância, pouco antes da puberdade, ocorre o crescimento de neurônios e espessamento da substância cinzenta que é seguido por uma poda durante a adolescência e início da idade adulta (ARAIN et al., 2013). Após esta proliferação neuronal, o encéfalo adolescente reestrutura-se sofrendo um processo benéfico denominado de poda dendrítica no qual são erradicadas sinapses não utilizadas e mielinização, cuja função é aumentar a velocidade de condução dos impulsos nervosos de circuitarias neuronais de regiões específicas cerebrais (GUERRI e PASCUAL, 2010; SEMPLE et al., 2013). Assim, este evento demarca a reestruturação e refinamento de conexão entre neurônios e glia (CREWS et al., 2007; GUERRI e PASCUAL, 2010).

Dessa forma, importantes mudanças estruturais e funcionais na plasticidade sináptica e conectividade neural ocorrem durante o desenvolvimento e maturação do SNC. Uma das últimas regiões do SNC que sofre este processo de maturação é o córtex pré-frontal. Esta região é responsável pela análise cognitiva, pensamento abstrato e a moderação do comportamento correto em situações sociais. Devido a isso, alguns adolescentes exibem imaturidade comportamental (ARAIN et al., 2013).

Estruturas cerebrais como amígdala, hipocampo, núcleo accumbens, hipotálamo e córtices frontal, pré-frontal e órbito-frontal formam o sistema límbico. Este sistema também

sofre maturação no período da adolescência (SPEAR, 2000; CREWS et al., 2007; GUERRI e PASCUAL, 2010). Estas regiões são responsáveis por mediar funções executivas - como controle do impulso, atenção, inibição da resposta e planejamento de tarefas - e respostas comportamentais complexas, tais como aprendizagem e memória (PASCUAL et al., 2011; SELEMON, 2013).

Dentre as alterações decorrentes da maturação do encéfalo adolescente estão envolvidas mudanças neuroquímicas, como a redução dos níveis de dopamina, resultando em mudanças de humor e dificuldades de regular emoções; e de serotonina, que está relacionada com controle de impulso diminuído dos adolescentes (ARAIN et al., 2013). Além disso, a neurotransmissão ácido γ -aminobutírico (GABA)érgica, particularmente no córtex pré-frontal, permanece sob construção durante o período da adolescência cuja consequência é o comportamento de excitação encontrado nesta fase da vida (ARAIN et al., 2013).

Aliás, a adolescência também é um período de maior plasticidade das respostas do eixo hipotálamo-pituitária- adrenal (HPA) [ARAIN et al., 2013]. Este eixo medeia respostas à estressores por ativação de neurônios do núcleo paraventricular no hipotálamo, promovendo liberação do fator liberador de corticotropina (*corticotropin-releasing fator* - CRF) para a glândula hipófise, esta, por sua vez, libera o hormônio adrenocorticotrópico (*adrenocorticotropic hormone* - ACTH) que atua sobre as glândulas adrenais elevando a produção de corticosterona (CORT) (LOGRIP et al., 2013). Este hormônio é produzido em maior quantidade principalmente ao despertar do sono e faz parte do ritmo circadiano natural (CLOW et al., 2010).

No entanto, a adolescência é um período de maior vulnerabilidade na função do eixo HPA que na fase adulta (ROMEO, 2010). Durante a puberdade, há aumento de receptores para hormônios esteroidais no sistema límbico que estimulam o desejo sexual, promovem volatilidade emocional e impulsividade. Estas mudanças estão relacionadas com a diminuição da dopamina e, conseqüentemente, os adolescentes podem exigir níveis mais elevados de estimulação dopaminérgica para alcançar os mesmos níveis de prazer /recompensar, levando-os a tomar decisões mais arriscadas (ARAIN et al., 2013).

Desta forma, a adolescência é caracterizada pelo aumento da busca de sensação, comportamento de risco, baixos níveis de evitar danos, impulsividade e ansiedade (GUERRI e PASCUAL, 2010). Em resumo, essas mudanças hormonais, físicas, psicológicas e sociais são características deste período do desenvolvimento (ARAIN et al., 2013). Estes fatores associados contribuem para o fenótipo de busca por novidades e comportamento de alto risco

que geram susceptibilidade à adição de drogas nos adolescentes (GUERRI e PASCUAL, 2010; ARAIN et al., 2013).

Sobre isto, vale ressaltar que durante o período da adolescência o córtex pré-frontal, envolvido no julgamento e controle inibitório, permanece sob maturação e pode ser dotado da capacidade de resposta a fatores ambientais, como consequência, está sujeito a maior vulnerabilidade a efeitos nocivos do abuso de drogas e estresse (GUERRI e PASCUAL, 2010; CREWS et al. 2007; SELEMON et al., 2013). Dessa forma, o encéfalo adolescente é mais susceptível aos efeitos neurotóxicos do consumo de EtOH devido à "janela de vulnerabilidade" criada pela assíncrona da maturação do córtex pré-frontal e sistema límbico (SKALA e WALTER, 2013).

Portanto, a exposição a drogas psicotrópicas durante as fases críticas do desenvolvimento, podem perturbar os processos de maturação e plasticidade cerebral acarretando em déficits comportamentais relacionados à memória, comportamento semelhante à ansiedade e prejuízos motores (GUERRI e PASCUAL, 2010). Além disso, podem também alterar áreas de recompensa sensíveis a agentes estressores gerando aumento da ansiedade e maior propensão à iniciação do consumo de drogas e dependência (SPEAR, 2000; GUERRI e PASCUAL, 2010).

2.3 Prevalência do consumo do álcool na adolescência

O álcool etílico é uma das mais antigas substâncias psicoativas utilizadas pela humanidade (BOUTROS et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2014; TEIXEIRA et al., 2014). Além de ter um histórico cultural, sendo aceito em quase todas as sociedades organizadas inclusive entre os adolescentes (BOUTROS et al., 2014; OMS, 2014), seu consumo é favorecido por ser uma droga lícita, de custo reduzido, amplamente disponível e de fácil acesso (JOHNSTON et al., 2009; JOHNSTON et al., 2014; OMS, 2014).

Aliado a estes fatores, o uso de álcool é incentivado pelo consumo em celebrações, situações sociais e de negócios, cerimônias religiosas e eventos culturais (MELONI e LARANJEIRA, 2004). Porém, o abuso desta substância pode desencadear uma cascata de problemas agudos de saúde, tais como, acidentes automobilísticos, problemas sociais, incluindo a violência doméstica, maltrato infantil, urgências e internações hospitalares, perda de produtividade no local de trabalho (MANZO-AVALOSS e SAAVEDRA-MOLINA, 2010), crimes e desordens públicas (REHM et al., 2009).

Além dos problemas agudos na saúde, a perda do controle sobre a ingestão do álcool resulta em uma doença psiquiátrica crônica e progressiva denominada de etilismo crônico ou dependência alcoólica (PETIT et al., 2013). Este distúrbio mais grave provoca acentuadas consequências fisiológicas e persistente prejuízo na qualidade de vida (SCHUCKIT, 2009). Ademais, o uso nocivo do álcool traz consequências para a saúde e a vida social do bebedor, assim como, para as pessoas ao seu redor e da sociedade em geral (OMS, 2010).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2014), o uso abusivo do EtOH está diretamente relacionado com cerca de 3,3 milhões de mortes por ano (5,9% de todas as mortes mundiais) e aproximadamente 5,1% de morbidades no mundo. Além disso, o consumo eventual e intenso dessa droga tem aumentado principalmente nas mulheres mais jovens constituindo, assim, o grupo de maior incremento na elevação desses índices tornando o álcool um problema de saúde pública emergencial (SCHUCKIT, 2009; INPAD, 2013).

Sobre as morbidades decorrentes do consumo abusivo do álcool, vale ressaltar que o padrão de consumo determina os riscos adversos sobre a saúde (OMS, 2010). Na verdade, os efeitos nocivos do álcool são determinados pela quantidade, período e frequência do consumo (BROWN e TAPERT, 2004; ZEIGLER et al, 2005; YANG et al, 2014). Conceitualmente, o padrão de consumo é denominado como pesado, moderado e leve que pode ser contínuo ou intermitente, bem como pode ocorrer de forma aguda ou crônica (NIAAA, 2004; OMS, 2014).

O termo *heavy drinking* geralmente é utilizado para o consumo de altas doses de EtOH na forma contínua e crônica, geralmente associado ao consumo frequente de 5 doses padrão de EtOH ou mais (NIAAA, 2016). Este modelo tem sido relacionado com a forma de consumo na desordem clínica do etilismo que é caracterizado pelo consumo compulsivo do álcool com desenvolvimento de tolerância e dependência (POMBO et al., 2015).

De outra maneira, beber de forma intermitente e episódica, ou em *binge drinking*, é o consumo em altas doses de EtOH em um curto período de tempo seguido por um período de abstinência (CREGO et al., 2010; PETIT et al., 2013; JACOBUS e TAPERT, 2013). O Instituto Nacional dos EUA sobre Abuso de Álcool e Alcoolismo (sigla do inglês *National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism*-NIAAA) preconizou que beber em *binge* é a concentração de 0,08 g/dL de EtOH no sangue após seu consumo, isso equivale em homens ao consumo de cinco doses ou mais de bebida em um período de duas horas e quatro doses ou mais de bebida no mesmo período para mulheres (NIAAA, 2004).

Apesar de este contexto ser comumente utilizado em muitos estudos, não há uma definição para o termo bebida (“drink”). De forma geral, a ingestão de álcool é descrita utilizando-se termos como: “drink”, “standard drink” ou “units”. Enquanto que uma unidade de álcool é definida como quantidade de álcool contendo em torno de 10 g de EtOH, havendo variações significantes entre países (de 8 g a quase 20 g de EtOH) de acordo com sua respectiva definição de standard drink, em países como EUA e Portugal, por exemplo, o padrão de bebida alcoólica é de 14 g de EtOH [Tabela 1] (ICAP, 2003; CREGO et al., 2010; SKALA e WALTER, 2013). O uso destes termos de forma aleatória torna difícil a comparação entre os diferentes estudos epidemiológicos, pois a quantidade de etanol puro pode ser aproximadamente estimada como 40 g em 1000 ml de cerveja a 5%, 95 g em 1000 ml de vinho a 12%, ou 316 g em 1000 ml de uma bebida destilada de 40% (ZERNIG et al., 2000). De outro modo, estudos experimentais são de comparação mais segura devido informar a quantidade de EtOH utilizada no estudo.

País	Standard drink (Gramas de Etanol)
Reino Unido	8
Holanda	9,9
Austrália, Áustria, Irlanda, Nova Zelândia, Polônia e Espanha	10
Finlândia	11
Dinamarca, França, Itália e África do Sul	12
Canadá	13,6
Portugal, Brasil e Estados Unidos	14
Japão	19,75

Tabela 1: Padrão de bebida em gramas de etanol (EtOH) - *Standard drink*- em diferentes países. Fonte: Adaptado do ICAP, 2003.

Este fenômeno de consumo intenso de álcool (intermitente ou em uma simples ocasião) tem recebido crescente interesse nas últimas décadas e tornou-se um fenômeno mundial e sua prevalência varia entre os países.

É um estilo de consumo proposital que é popular em vários países do mundo e se sobrepõe com o beber socialmente, visto que geralmente é feito em grupos. O grau de

intoxicação, no entanto, varia entre e dentro das várias culturas que se dedicam a esta prática. O *binge drinking* pode ocorrer ao longo de horas, durante vários dias, ou em caso de abuso prolongado, até semanas, tipicamente seguido por períodos de abstinência. Devido aos efeitos em longo prazo, o consumo excessivo de álcool é considerado um grave problema de saúde pública (MATHURIN e DELTENRE, 2009). Além disso, a repetição de episódios de compulsão durante adolescência constitui um fator de risco para ser um consumidor crônico na idade adulta (MATHURIN e DELTENRE, 2009; PETIT et al., 2013).

O consumo da droga de forma intermitente é conhecido por ser o tipo dominante de uso indevido do álcool em adolescentes e adultos jovens (CREGO et al., 2009). A frequência de consumo nessa população, principalmente de estudantes universitários, ocorre 3 vezes na semana particularmente às quintas-feiras e fins de semana (PARADA et al., 2011; BEETS et al., 2009). Porém a prevalência de consumo varia significativamente entre diferentes países (7 a 40%) (HIBELL et al., 2004; NEWES-ADEYI et al., 2005; WHITE, 2006; OMS, 2004). Parte dessa variabilidade pode ser atribuída à falta de critérios consistentes para o *binge* em amostras não-clínicas (estudantes universitários), do uso de diferentes definições no que diz respeito à quantidade de EtOH consumida e à frequência de episódios (CREGO et al., 2009).

De acordo com a definição de beber em *binge* anteriormente citada, um estudo em universidades dos EUA e Europa relataram que cerca de 40% dos alunos foram classificados como consumidores em *binge* (GILL, 2002). Estudo dos Centros para Controle de Doenças e Prevenção (EUA) encontraram uma prevalência de 72,5% dos estudantes de ensino médio que tenham tido pelo menos um episódio de *binge* com EtOH durante sua vida e 24,2% que tinham relatado ter bebido de forma intermitente nos últimos 30 dias anteriores à pesquisa; quase 40% dos estudantes entre 13-14 anos de idade já consumiram EtOH e um quinto (18%) já embriagaram-se pelo menos uma vez; os alunos da faixa de 17-18 anos de idade em mais de dois terços (72%) tinham consumido álcool e 50% já havia estado embriagado; além disso, 8%, 16% e 25% dos estudantes nas idades de 13-14, 15-16 e 17-18 anos respectivamente relataram ter bebido em *binge* nas últimas 2 semanas anteriores à pesquisa (CDC, 2009).

No Brasil, o II Levantamento Nacional de Álcool e Drogas- LENAD revelou que essa forma de consumo teve aumento dentre o gênero feminino (36%), especialmente as mais jovens, em níveis superiores aos índices totais de gêneros (31,1%) em relação ao ano de 2006 indicando que esse grupo é a população de maior risco na sociedade pelo aumento do consumo do EtOH na sua forma mais nociva (Figura 1; INPAD, 2013).

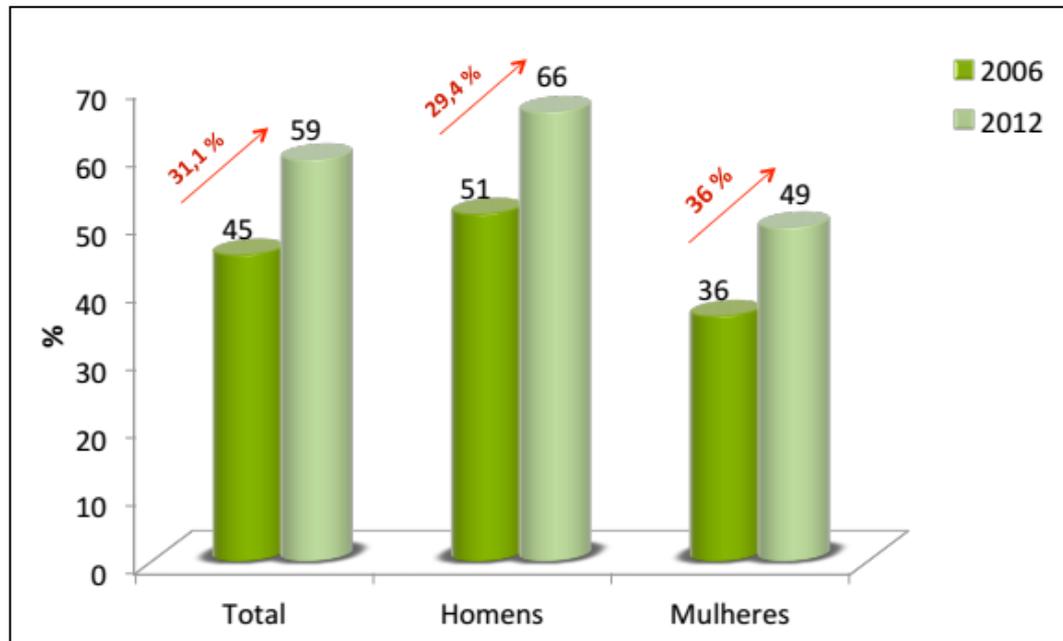


Figura 1: Registro do consumo de EtOH na forma de *binge*, no Brasil. 2006 – 2012.

Fonte: Adaptado do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Políticas Públicas do Álcool e outras Drogas - INPAD, 2013.

As leis brasileiras proíbem a venda e o consumo de bebidas alcoólicas por adolescentes com menos de 18 anos de idade (ROMANO et al., 2007), no entanto, quase 16% dos adolescentes com idade entre 14-17 anos de idade já tiveram envolvidos em consumo de EtOH na forma *binge* (PINSKY et al., 2010). Sanchez et al. (2011) demonstraram por meio de uma amostra representativa de alunos de escolas particulares, na maior cidade do país (São Paulo), que a prevalência do consumo intermitente de álcool durante o mês anterior à pesquisa foi de 33%, particularmente entre os adolescentes mais ricos. Além disso, outro estudo realizado por Sanchez e colaboradores (2013) revelou que ao contrário do que é observado em países desenvolvidos, os estudantes brasileiros de alto nível socioeconômico podem ter um risco aumentado ao consumo do EtOH em *binge*.

Em geral, o EtOH altera diversos órgãos e sistemas gerando diversas disfunções fisiológicas como desordens neuropsiquiátricas (ou seja, episódios depressivos, ansiedade grave), déficits cognitivos, deficiência motora, doenças cardiovasculares (ou seja, a doença isquêmica do coração e acidente vascular cerebral isquêmico), doenças gastrointestinais (como cirrose hepática e pancreatite), câncer, atrofia das glândulas salivares e redução da densidade óssea (SCHUCKIT, 2009; OLIVEIRA et al., 2014; OMS, 2014; BANNACH et al., 2015; FERNANDES et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2015; FONTES-JÚNIOR et al., 2016).

De fato, cada uma destas alterações está associada à modalidade, ao tempo e à dose do consumo (BROWN e TAPERT, 2004; ZEIGLER et al., 2005; MEDINA et al., 2008). No entanto, estas alterações são mais perigosas e mais acentuadas quando o consumo do álcool inicia na adolescência.

2.4 Álcool como fator de risco na adolescência

2.4.1 FARMACOCINÉTICA DO ÁLCOOL

O álcool é uma classe de compostos orgânicos com presença de um grupo hidroxila ligado diretamente a um carbono saturado. Esta característica influencia diretamente nas propriedades farmacocinéticas desta droga (GOULLÉ e GUERBET, 2015). Por ser uma molécula fracamente carregada, ele atravessa livremente as membranas por difusão passiva e atinge o equilíbrio de concentração sangue/tecidos de maneira rápida (SCHUKIT, 2004; CEDERBAUM, 2012).

Devido à forte interação com a água, o EtOH uma vez ingerido é rapidamente distribuído. Dessa forma, seu volume de distribuição está relacionado ao teor de água corpóreo, o que é parcialmente responsável por diferenças relacionadas à idade e sexo (NORBERG et al., 2003). Nas mulheres, por exemplo, BAC tende a ser maior do que nos homens, porque as mulheres geralmente têm menor massa muscular e maior quantidade de tecido adiposo, com a composição aquosa proporcionalmente menor. Da mesma forma, as variações são observadas de acordo com a idade e peso (GRAHAM et al., 1998).

O metabolismo do álcool ocorre majoritariamente no fígado, em torno de 90% (CISA, 2016). A principal via de metabolismo do EtOH é por meio da enzima álcool desidrogenase (ADH), no entanto, tem-se descrito outras duas vias alternativas que realizam a oxidação do EtOH: catalase e sistema de enzimas microssomais oxidativas - citocromo P450 2E1 (CYP2E1), o produto de reação em todos os três casos é o acetaldeído. Em seguida, a enzima aldeído desidrogenase (ALDH) converte o acetaldeído em acetato (Figura 2; ZAKHARI, 2006; CISA, 2016).

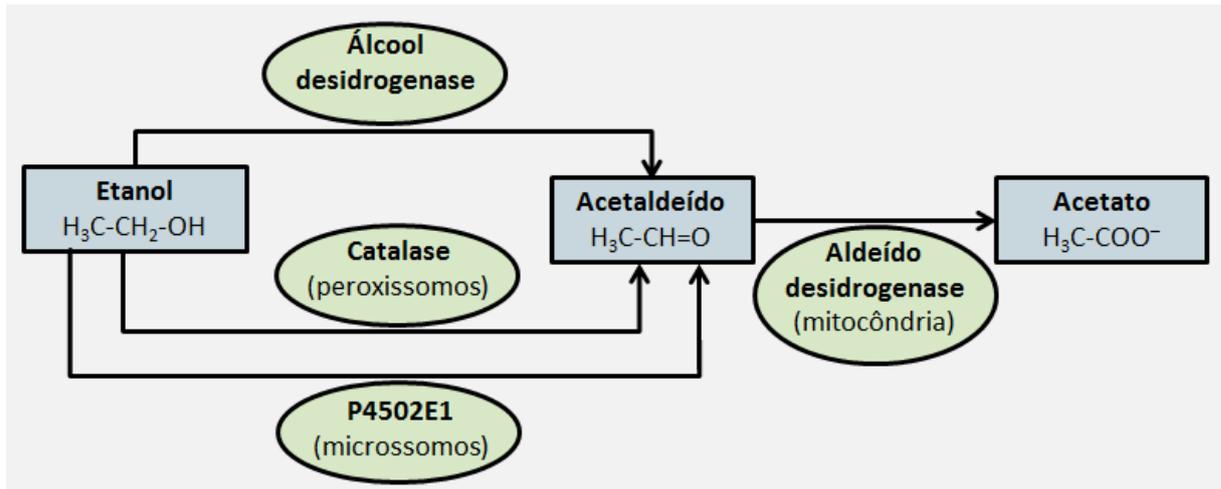


Figura 2: Metabolismo do EtOH.

Fonte: Centro de informações sobre saúde e álcool – CISA, 2016.

A catalase é uma heme enzima presente nos peroxissomos das células que possui um importante papel na atividade enzimática antioxidante, mas também atua na oxidação do EtOH não mais que 2% do metabolismo hepático. No entanto, tem um importante papel no metabolismo do EtOH no cérebro (VONGHIA et al., 2008).

Uma relevante consequência do metabolismo EtOH é o aumento da formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) associados a danos celulares (CEDERBAUM, 2012). Dessa forma, o EtOH manifesta os seus efeitos prejudiciais, dentre outros fatores, através da liberação de EROs ou contribuindo para outros mecanismos que promovam dano oxidativo consequente (OSTROWSKA et al., 2004). Adicionalmente, é bem aceito na literatura que o estresse oxidativo desempenhe um importante papel como via envolvida nos mecanismos tóxicos derivado do consumo do álcool (HARPER, 2009).

2.4.2 EFEITOS DO ETOH SOBRE PROCESSOS FISIOLÓGICOS

2.4.2.1 ESTRESSE OXIDATIVO

O estresse oxidativo refere-se ao desequilíbrio oxidativo decorrente de elevados níveis de radicais livres e baixos níveis de antioxidantes nas células, conduzindo a oxidação de lipídeos, proteína e DNA gerando dano celular (VASCONCELOS et al., 2007; NOGALES et al., 2014).

EROs são pequenas moléculas altamente reativas que contém oxigênio, tais como o radical superóxido, radical hidroxila, peróxido de hidrogênio, peróxidos de lipídeos, peróxidos

de proteínas (GALIZA-MORENO e GUTIÉRREZ-REYES, 2014). Estas espécies reativas geram dano celular, em contrapartida, todos os tecidos do corpo, incluindo o SNC, têm a capacidade de neutralizar os radicais de oxigênio por mecanismos antioxidantes que incluem a atividade enzimática da SOD e catalase, estas enzimas convertem o ânion superóxido em peróxido de hidrogênio e peróxido de hidrogênio em água, respectivamente (VASCONCELOS et al., 2007; NOGALES et al., 2014).

Vale ressaltar que o excesso de espécies reativas pode provocar danos em moléculas como oxidação de lipídios, sendo assim produzindo malondialdeído (MDA) que caracteriza o evento denominado de peroxidação lipídica. O MDA é o produto final da peroxidação lipídica de ácidos graxos poli-insaturados, os quais são susceptíveis ao ataque oxidativo por EROs. Sendo assim o MDA é um biomarcador para este tipo de dano, e indicativo de liberação excessiva de EROs (LIU et al., 2011; YANG et al., 2015).

Deve-se salientar que o consumo excessivo de álcool provoca danos profundos para sistemas e órgãos humanos e são reproduzidos em roedores, incluindo fígado, cérebro, glândulas salivares, coração, pâncreas, pulmões, sistema endócrino, sistema imunológico, bem como ossos e músculos esqueléticos (LAUING et al., 2008; LINDTNER et al., 2013; NOGALES et al., 2014; TEIXEIRA et al., 2014; FONTES-JÚNIOR et al., 2016). Estes danos estão associados ao estresse oxidativo decorrente do metabolismo do álcool, no qual pode aumentar a produção de EROs, e ao mesmo tempo, reduzir a atividade dos mecanismos protetores antioxidantes resultando no estresse oxidativo (WU e CEDERBAUM, 2003).

Desta forma, o EtOH altera diversos órgãos e sistemas, inclusive, o SNC (TEIXEIRA et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2014). Alguns estudos relatam o papel de processos como neuroinflamação e de estresse oxidativo associados a eventos de excitotoxicidade para explicar os danos funcionais envolvidos com este sistema, como prejuízos motores, cognitivos e no comportamento semelhante à ansiedade decorrente do consumo intermitente e episódico de EtOH (PASCUAL et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2014; TEIXEIRA et al., 2014).

2.4.2.2 TOXICIDADE SOBRE O SNC

O EtOH se move livremente através da bicamada lipídica celular e age em proteínas receptoras ou efetoras distintas, através de interações diretas ou indiretas (WITT, 2010). Em concentrações muito elevadas, o álcool pode até mesmo alterar a composição lipídica que envolve a membrana e interferir diretamente com a função de vários canais iônicos e receptores, aumentando a atividade dos receptores GABAA, dopamina (tanto receptores D1 e D2) e

serotonina (principalmente de 5-HT₃) e bloqueando os receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) (VENGELIENE et al, 2008; ADAMS et al, 2010; WITT, 2010; PICKENS e CALU, 2011). Entre os sistemas de neurotransmissores, os mais afetados são o gabaérgico e glutamatérgico (KUMAR et al., 2013).

A utilização de doses elevadas ou aguda de EtOH aumenta a atividade inibitória gabaérgica, uma vez que esta droga produz modulação alostérica positiva sobre os receptores GABAA e facilita a libertação pré-sináptica do GABA (VENGELIENE et al., 2008). Atualmente, está bem descrito que tal mecanismo contribui para muitos efeitos neurocomportamentais, tais como a desinibição, atividade sedativa-hipnótica, disfunção cognitiva, ataxia e incoordenação motora (KUMAR et al, 2009; SCHUCKIT, 2009; HEILIG et al., 2011). No entanto, as prováveis consequências do aumento da atividade do sistema GABAérgico no encéfalo em desenvolvimento parece produzir neurodegeneração e apoptose generalizada em diferentes regiões do SNC (YOUNG et al., 2008).

Por outro lado, o glutamato (Glu) é o principal neurotransmissor excitatório do SNC (CASILLAS-ESPINOSA et al., 2012). Existem receptores ionotrópicos (iGluR) e metabotrópicos (mGluR), os quais medeiam a resposta deste neurotransmissor e geram potenciais pós-sinápticos, regulando uma ampla variedade de processos fisiológicos, incluindo atividade neurotrófica e plasticidade sináptica (CASILLAS-ESPINOSA et al., 2012; MÖYKKYNNEN e KORPI, 2012). Além disso, os receptores de NMDA desempenham um papel central em muitos processos do SNC, tais como as funções cognitivas, comportamento relacionado à ansiedade, controle motor, aprendizagem e memória (MÖYKKYNNEN e KORPI, 2012).

O consumo do EtOH na forma aguda envolve o bloqueio de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA e ativação excessiva dos receptores do tipo GABAA (IKONOMIDOU et al., 2000; MILLER, 2006). A ocorrência destes eventos moleculares promove efeitos comportamentais típicos do consumo da droga como sedação, hipnose e ataxia (MARTZ et al., 1983; KUMAR et al., 2004; BOTTA et al., 2007), além de prejuízos no processo mnemônico e de emocionalidade (MÖYKKYNNEN e KORPI, 2012).

No período de abstinência, entretanto, estudos relatam uma diminuição na densidade dos receptores GABAA cerebrais e uma regulação negativa desta via (“*down-regulation*”) (VENGELINE et al., 2008; JUNG e METZGER, 2010). Associada ao processo excitotóxico que ocorre a partir da exacerbação da via de sinalização excitatória comparada à via inibitória,

ou seja, um excesso de ligação de glutamato a receptores NMDA em detrimento à sinalização gabaérgica (VENGELINE et al., 2008). Portanto, adaptações nestes sistemas parece desempenhar um papel importante no desenvolvimento de tolerância ao álcool, esse contexto contribui para a ansiedade e insônia durante a abstinência alcoólica aguda e prolongada (Schuckit, 2009).

Essa superatividade de NMDA intensifica a abertura de canais de Ca^{2+} e Na^{+} dependentes de ligante que alteram o potencial elétrico do neurônio e abrem também os canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem, promovendo intenso influxo desse íon para o citosol, desencadeando uma cascata de eventos intracelulares, resultando em degeneração neuronal (BERLIOCCI et al., 2005; JAATINEN e RINTALA, 2008). Este processo mediado por glutamato tem íntima relação com danos mitocondriais e estresse oxidativo (NOVELLI et al., 1998).

Por conseguinte, o consumo de EtOH afeta populações celulares do SNC, neurônios e células gliais, podendo causar aumento da ativação microglial e hipertrofia astrocitária, aumentando os níveis teciduais de citocinas, com elevação da atividade da caspase-3, indução da ciclooxigenase-2 (COX-2) e da óxido nítrico sintase induzida no córtex cerebral (ALFONSO-LOECHES, 2010). Além disso, tais eventos podem estar associados com o processo de neurodegeneração causando liberação de radicais superóxidos e consequente morte neuronal que causam alterações neurocomportamentais (ZOU e CREWS, 2005; CREWS e NIXON, 2008; PASCUAL et al., 2007).

No entanto, algumas regiões do encéfalo como o córtex cerebral, hipocampo e cerebelo são mais vulneráveis à exposição ao EtOH e seus efeitos de abstinência (JUNG e METZGER, 2010). O córtex motor tem sido reconhecido por desempenhar um importante papel no controle motor fino e independente, como os movimentos de alcance e preensão, integração sensório-motor e movimentos de ordem superior cognitivo-motor (ADKINS et al., 2006; JUAN et al., 2011). Estudos demonstram o papel do córtex motor, ou interrupções corticais, no desempenho de tarefas comportamentais como teste do campo aberto, pole test, *beam walking test* e rotarod que foram utilizados neste estudo, bem como, alterações nessa área encefálica podem estar associadas a prejuízos neuromotores (ALLEN et al., 2000; PASCUAL et al., 2007; TEIXEIRA et al., 2014).

O sistema motor constitui-se por possuir uma complexa rede de áreas motoras corticais e subcorticais, em que populações neuronais interagem entre si, por meio de mecanismos

excitatórios e inibitórios (BREAKSPEAR et al., 2003; HOSP e LUFT, 2011). Este sistema é constituído por um conjunto de 3 unidades (unidade de comando, de controle e de ordenação) no qual o movimento é idealizado, planejado e comandado pelo córtex, sob supervisão da unidade de controle, a qual é constituída pelos núcleos da base e cerebelo que adequam e corrigem o movimento realizado reenviando a informação às estruturas corticais por meio de uma alça de retroalimentação (DELONG e WICHMANN, 2007; HANDLEY et al., 2009). Então, após a adequação e correção do movimento, a informação é transmitida até a unidade de ordenação que consiste de motoneurônios da medula e do tronco encefálico (KANDEL et al., 2003).

Distúrbios do movimento, hiperkinéticos e hipocinético estão associados ao funcionamento anormal da circuitaria intrínseca dos núcleos da base por meio da hipoatividade seletiva da área motora suplementar e córtex pré-frontal dorsal, que são áreas de associação frontais que recebem entrada subcortical principalmente a partir dos gânglios da base (BROOKS, 1999; GRAFTON, 2004). O desenvolvimento da bradicinesia, redução da amplitude e velocidade do movimento, é amplamente encontrado em doenças neurodegenerativas do SNC como a doença de Parkinson (BROOKS, 1999; GRAFTON, 2004; PHILLIPS et al., 2009). Este evento ocorre principalmente após lesões e morte de células dos terminais dopaminérgicos do estriado e desordens cerebelares (OGAWA et al., 1985; DIGUET et al., 2005; HANDLEY et al., 2009).

Outras áreas centrais, tais como o córtex pré-frontal, que medeia funções executivas como as respostas comportamentais complexas e a memória de trabalho (SELEMON, 2013), são alvo para os efeitos tóxicos do EtOH, onde há a redução do volume desta área, assim como, de outras áreas como o hipocampo, ocasionando repercussões funcionais negativas sobre ansiedade e memória (CREGO et al., 2010; GUERRI e PASCUAL, 2010). Estas áreas são as últimas regiões encefálicas a maturar e podem ser dotadas da capacidade de resposta a fatores ambientais, como consequência, estão sujeitas a maior vulnerabilidade a efeitos nocivos do abuso do EtOH (CREWS et al., 2007).

O EtOH é conhecido por ser um dos estressores que ativam o eixo HPA elevando os níveis de CORT após o consumo agudo desta droga na idade adulta (UHART e WAND, 2008), enquanto que o padrão de consumo em repetidas exposições e em quadros de dependência geram uma redução da ativação do eixo (LOGRIP et al., 2013). Além disso, o consumo de EtOH durante a adolescência exerce efeitos a longo prazo sobre os circuitos de estresse no

encéfalo adulto, causando prejuízos funcionais que persistem na vida adulta (VARLINSKAYA et al., 2014; LOGRIP et al., 2013).

Tem crescido uma forte evidência sobre a relação entre o estresse, ansiedade e desordens do abuso do álcool em adolescentes (SILBERMAN et al., 2009). O padrão de consumo em *binge* de EtOH, além de ser um precursor ao alcoolismo crônico, gera maiores alterações no SNC que são especialmente perigosas devido às altas doses ingeridas seguidas de abstinência, sendo mais rápidos e mais severos os danos que o consumo crônico em baixas doses (SKALA e WALTER, 2013). A transição do consumo em *binge* para a dependência do EtOH envolve a desregulação dos circuitos que medeiam respostas comportamentais a estressores, não só dos circuitos neurais envolvidos no processo de recompensa. A ativação deste eixo HPA, está associado com elevado estado de ansiedade (GILPIN e KOOB, 2008; WILLEY et al., 2012).

Dentre outros fatores, a resposta do eixo HPA ao EtOH poderia contribuir para o consumo excessivo de álcool frequentemente observado durante a adolescência e aumento do abuso na idade adulta (SILVERI e SPEAR, 2004; LOGRIP et al., 2013). No entanto, a resposta do eixo HPA ao consumo do EtOH no período da adolescência possui um efeito muito mais proeminente nas fêmeas que em machos (SILVERI e SPEAR, 2004, WILLEY et al., 2012).

Durante a puberdade, início da adolescência, ocorre a neuromaturação no qual envolve alterações na neurotransmissão e plasticidade que estão associados com modificações estruturais em algumas regiões do encéfalo influenciando o desenvolvimento do SNC (CREWS e BAUN, 2003; HAO et al., 2003; TATENO et al., 2005; ARAIN et al., 2013). Adicionado a isso, tem-se demonstrado que a neurogênese durante este estágio de desenvolvimento crítico da maturação cerebral é potentemente inibida pela ação do EtOH (SKALA e WALTER, 2013). Dessa forma, a exposição ao EtOH durante esta fase da vida produz alterações neurocomportamentais que diferem daquelas observadas em indivíduos adultos (PASCUAL et al., 2007).

A neuroplasticidade é requerida na aquisição de novas tarefas (ARAIN et al., 2013). Além disso, esta habilidade encontra-se aumentada na adolescência por conta dos elevados níveis de neurogênese hipocampal nos quais novos circuitos funcionais são formados (BRIONES e WOODS, 2013; MCCLAIN et al., 2013; VETRENO e CREWS, 2015). Neste evento é descrito que células progenitoras neurais estejam presentes na zona subgranular do giro denteado do hipocampo e atue na neurogênese constitutiva na qual funções hipocampais

necessitariam deste processo intacto (KEMPERMANN et al., 2004, IMAYOSHI et al., 2008; KEMPERMANN et al., 2016).

Um importante fator relacionado à fisiologia deste processo é o fator neurotrófico derivado do encéfalo (*brain-derived neurotrophic fator* - BDNF) que está envolvido na migração de células progenitoras neurais presentes na zona subgranular do giro denteado do hipocampo e tem um papel essencial em eventos de plasticidade neuronal e funções importantes como aprendizado e memória (TYLER et al., 2002; SCHARFMAN et al., 2005). Além disso, este fator neurotrófico é essencial para a manutenção da sobrevivência neuronal durante o desenvolvimento e na vida adulta (KULKARNY et al., 2011).

Funcionalmente, o BDNF auxilia o processo mnemônico no qual possui tipos de memórias classificadas de acordo com sua duração e natureza, dentre elas estão: memória de longa duração, na qual pode permanecer durante horas, dias e anos; memória de curta duração, na qual o tempo de retenção pode dar-se em minutos ou horas; memória declarativa (episódica- quando envolve eventos relacionados ao tempo e datas, ou semântica- quando relacionada a conceitos atemporais), que pode ser evocada por meio de palavras ou de outros estímulos; memória não-declarativa (memória de trabalho- utilizada para armazenar temporariamente informações que são necessárias para raciocínio imediato, resolução de problemas, ou memória de procedimento- a qual está relacionada com aquisição de dados mediante repetição) na qual não necessita ser descrita por palavras (IZQUIERDO, 1999; IZQUIERDO, 2006).

A tarefa de reconhecimento de objeto, utilizado neste estudo, é amplamente reconhecida como uma tarefa de memória de trabalho, que é facilitada pela tendência natural do rato para a novidade e avalia a capacidade de discriminação entre objetos familiares e não familiares (PIRES et al., 2009). Este tipo de tarefa necessita da integridade no funcionamento de estruturas como hipocampo, córtex pré-frontal medial e é provável que seja dependente da função de outras regiões encefálicas, tais como, córtico-límbicas - incluindo bulbo olfatório, giro dentado do hipocampo e córtex entorrinal (NADEL, 1991; CIPPITELLI et al., 2010; BARKER e WARBURTON, 2011). Sabe-se que doses elevadas de EtOH administradas em um único episódio de *binge* produz neurotoxicidade nestas áreas (CREWS et al., 2000; PASCUAL et al., 2007; CIPPITELLI et al., 2010).

III JUSTIFICATIVA

3. JUSTIFICATIVA

O consumo de EtOH é um problema da saúde pública no Brasil e as mulheres, principalmente as mais jovens, aumentaram o consumo desta droga de forma episódica e intensa. O consumo de EtOH durante a adolescência exerce efeitos a longo prazo. Esta droga possui diferentes alvos de atuação e compromete áreas encefálicas, principalmente região cortical e hipocampo e a produção de BDNF que ocorre nestas regiões. Estas áreas estão funcionalmente associadas ao comportamento motor, ansiedade e memória. Além disso, um dos principais locais de adaptações induzidas pelo EtOH é o eixo HPA cujo sistema medeia respostas à estressores.

Diante deste cenário, este trabalho visa investigar os efeitos pós-consumo de EtOH no modelo *binge drinking* em diferentes períodos de intoxicação durante o desenvolvimento de fêmeas sobre o processo mnemônico, comportamento relacionado à ansiedade, comportamento motor e processos bioquímicos, mimetizando o padrão de ingestão observado entre o grupo de estudo.

IV OBJETIVOS

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Caracterizar as respostas comportamentais, teciduais e bioquímicas derivadas do consumo intermitente e episódico de EtOH em ratas na fase de adolescência à idade adulta.

4.2 Objetivos específicos

Avaliar o efeito decorrido do consumo de EtOH em *binge drinking* agudo na adolescência, repetidos episódios durante a adolescência e da adolescência à fase adulta de ratas, assim como, as consequências após retirada prolongada do consumo da droga sobre:

- ✓ A atividade locomotora espontânea utilizando teste do campo aberto;
- ✓ Coordenação motora e equilíbrio por meio de locomoção espontânea sobre vigas graduadas e locomoção forçada sobre cilindro giratório (testes do *beam walking* e rotarod, respectivamente);
- ✓ A ocorrência de bradicinesia avaliada no teste de descida em viga vertical (*pole test*);
- ✓ O comportamento relacionado à ansiedade dos animais no teste do labirinto em cruz elevado (LCE);
- ✓ O processo mnemônico no tocante à memória de curta duração relacionada à tarefa de reconhecimento de objetos;
- ✓ A quantidade de imunoconteúdo de BDNF no hipocampo dos animais submetidos a diferentes episódios de EtOH por meio do método de *Western blot*;
- ✓ Os níveis de CORT no sangue dos animais submetidos a diferentes episódios de EtOH;
- ✓ O balanço oxidativo sanguíneo através dos níveis de peroxidação lipídica e atividade enzimática de catalase e SOD.

V METODOLOGIA

5. METODOLOGIA

5.1 Animais e grupos experimentais

Este estudo foi inicialmente submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa com Animais de Experimentação da Universidade Federal do Pará (CEPAE-UFGA), sob apreciação do parecer número BIO196-14 (ANEXO C), obedecendo-se aos critérios e às normas estabelecidas por Guias de Cuidado e Uso de Animais Laboratoriais (COMMITTEE FOR THE UPDATE OF THE GUIDE FOR THE CARE AND USE OF LABORATORY ANIMALS, 2011).

Foram utilizados ratos *Wistar*, fêmeas (n= 80), com 35 dias de vida, pesando em média $72,83 \pm 0,36$ gramas provenientes do Biotério da UFGA. Estes animais foram encaminhados para Faculdade de Farmácia, UFGA, onde foram mantidos em uma sala de manutenção em condições padronizadas de temperatura (25°C), exaustão, ciclo de luz claro/escuro de 12 horas (7:00 - 19:00 horas), água e comida *ad libitum*. Nas salas onde ocorreram os ensaios comportamentais utilizou-se lâmpadas fluorescentes para iluminação e controle de temperatura e ruído.

Este estudo foi realizado com grupos independentes (ou seja, cada animal foi utilizado apenas uma vez). Desta forma, a amostra de 80 animais foi dividida em dois grupos experimentais denominados de controle e EtOH distribuídos em números diferentes de episódios de intoxicação e seu respectivo controle. Conforme ilustra a tabela abaixo (Tabela 2):

GRUPO		DESCRIÇÃO	IDADE	NÚMERO
1 <i>Binge drinking</i> (BD)	Controle	Animais tratados com H ₂ O _{dest.} por 3 dias consecutivos	35-37 DPN	10
	Etanol	Animais tratados com EtOH em 1 sequência de repetidos episódios de <i>binge</i> , 3 dias consecutivos, (<i>binge</i> agudo)	35-37 DPN	10
4 <i>Binge drinking</i> (BD)	Controle	Animais tratados com H ₂ O _{dest.} por 4 semanas, 3 dias consecutivos/ semana	35-58 DPN	10
	Etanol	Animais tratados com EtOH em 4 semanas de repetidos	35-58 DPN	10

		episódios de <i>binge</i> , 3 dias consecutivos/ semana		
8 <i>Binge drinking</i> (BD)	Controle	Animais tratados com H ₂ O _{dest.} por 8 semanas, 3 dias consecutivos/ semana	35-86 DPN	10
	Etanol	Animais tratados com EtOH em 8 repetidos episódios de <i>binge</i> , 3 dias consecutivos/ semana	35-86 DPN	10
Abstinência-14 dias	Controle	Animais tratados com H ₂ O _{dest.} por 8 semanas (3 dias consecutivos/ semana) adicionado de 14 dias sem qualquer administração	35-100 DPN	10
	Etanol	Animais tratados com EtOH em 8 semanas de repetidos episódios de <i>binge</i> , 3 dias consecutivos/ semana, seguidos de 14 dias de abstinência (sem qualquer gavagem)	35-100 DPN	10

Tabela 2: Distribuição dos grupos experimentais, descrição e quantidade de animais por grupo.

5.2 Tratamento com EtOH

Inicialmente as ratas foram mantidas em caixas próprias em grupos de 5 animais para evitar o estresse pelo isolamento. Foi administrada por via oral (gavagem), através de cânula orogástrica (Insight, Brasil), água destilada (H₂O_{dest.}) ou EtOH (Nuclear, Brasil) na dose de 3 g/kg/dia (20 p/v) (LAUING et al., 2008; LINDTNER et al., 2013; NOGALES et al., 2014) durante três dias consecutivos semanalmente nos animais do 35° ao 86° dia pós-natal (DPN), o que corresponde o período de adolescência à fase adulta neste modelo animal (SPEAR, 2000; 2004). O grupo controle recebeu volumes equivalentes de H₂O_{dest.} por administração via intragástrica.

A pesagem dos animais foi realizada semanalmente para o ajuste de dose e nenhuma morte foi observada ao longo dos repetidos episódios de EtOH. Os cálculos de preparo para a dose (3 g/kg/dia) e solução (20 p/v) do EtOH, foram realizados conforme descrição abaixo. Para isto, foi considerado:

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

$$\begin{array}{l}
 1) \quad 0,79 \text{ g/mL} \text{ ----- } 99,5\% \\
 \quad \quad \quad X \text{ ----- } 20\% \\
 \quad \quad \quad X = 0,16 \text{ g/mL}
 \end{array}$$

$$\begin{array}{l}
 2) \quad 1\text{mL} \text{ ----- } 0,16 \text{ g} \\
 \quad \quad \quad X \text{ ----- } 3 \text{ g} \\
 \quad \quad \quad X = 18,75 \text{ mL}
 \end{array}$$

$$\begin{array}{l}
 3) \quad 18,75 \text{ mL (=3 g)} \text{ ----- } 1000 \text{ g} \\
 \quad \quad \quad X \text{ ----- } 100 \text{ g} \\
 \quad \quad \quad X = 1,8 \text{ mL}
 \end{array}$$

$$\begin{array}{l}
 4) \quad 100\text{g} \text{ ----- } 1,8 \text{ mL} \\
 \quad \quad \quad P \text{ (g)} \text{ ----- } X \\
 \quad \quad \quad X = 1,8xP/100, \text{ onde } P=\text{peso do animal em gramas}
 \end{array}$$

Para avaliar a habilidade dos animais em reverter os possíveis efeitos do tratamento com EtOH na forma de *binge* sobre o SNC ou se as prováveis alterações perduram, foi adicionado um grupo de ratas intoxicadas com EtOH ou H₂O_{dest.} por 8 semanas, como mencionado previamente, e seguidos de 14 dias sem tratamento (100 DPN). O esquema de tratamento experimental com EtOH em ratas da adolescência à fase adulta está descrito na figura 3.

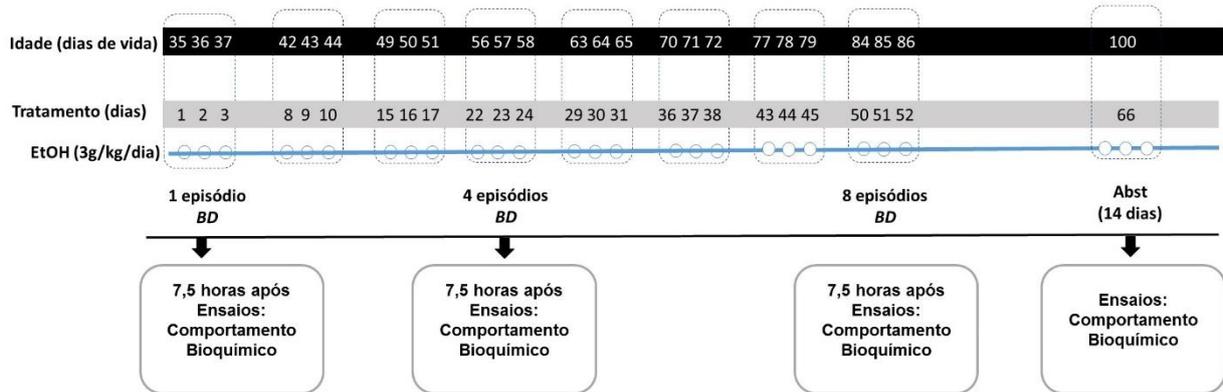


Figura 3: Esquema do tratamento experimental com EtOH na forma de *binge drinking*. Os tratamentos com EtOH (3 g/kg/dia) ou H₂O_{dest.} foram realizados por 3 dias consecutivos semanalmente, dessa forma, os grupos de animais foram submetidos aos ensaios comportamentais nas idades de 37, 58 e 86 dias pós-natal (DPN). Além disso, os grupos 14 dias de abstinência (controle e EtOH) foram analisados na idade de 100 DPN.

5.3 Dosagem da concentração alcoólica sanguínea

A alcoolemia foi avaliada em grupos separados de animais com 37 DPN ($n = 5$ animais por grupo) a fim de obter os valores da dosagem alcoólica sanguínea no pico farmacocinético do EtOH, segundo Livy e colaboradores (2003), para certificação da ocorrência do *binge drinking* no protocolo utilizado e realização dos ensaios comportamentais com concentração de EtOH não detectável no sangue. Após um protocolo de administração de EtOH (3 g/kg/dia) por três dias consecutivos, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e as amostras de sangue foram coletadas por via intracardíaca 60 min e 450 min após a administração do EtOH, transferidas para tubos heparinizados e, em seguida, armazenadas a 4°C até que a concentração da alcoolemia fosse mensurada. Resumidamente, o sangue homogeneizado (500 μ L) foi adicionado ao butanol como padrão interno (500 μ L) e analisados por cromatografia gasosa (GC-MS) com detector por ionização de chama (FID- *Flame Ionization Detector*) em equipamento de GC-MS (Walnut Creek, CA, EUA), modelo CP3800 equipado com injeção de amostras automática (CombPalm número de série 1210469). Utilizou-se a coluna capilar (cera CP 52 OC, Varian), que consiste de polietileno (100%), com as dimensões de 30 m x 0,32 milímetros \times 0,25 μ m de espessura do filme. A temperatura do detector foi de 250 °C e o injetor foi de 200°C.

5.4 Ensaios comportamentais

Após o período de tratamento com EtOH, antes do início dos ensaios comportamentais, os animais foram conduzidos à sala de teste por um período de, no mínimo, uma hora para aclimação e habituação ao ambiente de realização dos ensaios. Todos os experimentos

comportamentais foram realizados em sala própria, com atenuação dos níveis de ruído e baixa intensidade de iluminação (12 lx).

A concentração sanguínea de EtOH em ratos, administrado por gavagem, possui um declínio gradual e dura em torno de 450 minutos para ser eliminado do organismo (LIVY et al., 2003), dessa forma, os testes foram realizados 7,5 horas (sete horas e trinta minutos) após a última administração de EtOH/ H₂O_{dest.}, não excedendo o horário de 18 horas a fim de não interferir no ciclo circadiano do animal.

5.4.1 ESTUDO DOS EFEITOS DO ETOH SOBRE O COMPORTAMENTO MOTOR

5.4.1.1 TESTE DA ATIVIDADE LOCOMOTORA ESPONTÂNEA/ CAMPO ABERTO (*OPEN FIELD*)

Neste estudo, foi utilizado um aparato que consiste em uma arena cuja área central é aversiva para o animal conhecido como modelo do campo aberto (AGUIAR, 1995), proposto para avaliação simultânea da locomoção, exploração e comportamento semelhante à ansiedade por meio da atividade locomotora espontânea (WALSH e CULMMINS, 1979; KARL et al., 2003), uma vez que um ambiente não habituado mimetiza um conflito natural dos roedores entre a tendência de explorar um novo ambiente e evitar uma área aberta aversiva (PANDOLFO et al., 2007).

A comparação da atividade locomotora no centro em relação à periferia do aparato indica um comportamento semelhante à ansiedade (HALL et al., 1976). Por outro lado, a contagem do número de quadrantes cruzados pelo animal e o número de levantamentos exploratórios (frequência de *rearings*) são parâmetros usados como medida da atividade locomotora espontânea (BAHI, 2013; OLIVEIRA et al. 2014). Além disso, o aumento de eventos de imobilidade do animal no aparato é um parâmetro amplamente utilizado como indicativo de alto grau de estresse (WALSH e CULMMINS, 1979; KARL et al., 2003).

Para este estudo, foi utilizada uma arena em madeira cujo piso (100 x 100 cm) e as paredes (40 cm de altura) possuem a cor preta cobertos com Fórmica impermeável. O chão do aparato foi dividido por um sistema de monitoramento de vídeo ANY-mazeTM versão 4.99 (Stoelting Co., USA) em 25 quadrantes iguais (20 x 20 cm) separados em duas zonas para avaliação da tigmotaxia: central (36%) e periférica (64%).

Inicialmente os animais foram colocados individualmente no centro do campo aberto sendo permitido o livre deslocamento dentro do aparato por 5 minutos, seus movimentos ao longo da sessão foram registrados através de filmadora posicionada acima da arena (Figura 4).

De acordo com o protocolo de Brenes et al. (2009), foram mensuradas as variáveis de locomoção total, referentes à distância total percorrida; frequência do número de *rearings*, verificado pela postura sustentada com patas posteriores no chão mantendo as patas dianteiras levantadas; distância percorrida nos quadrantes centrais e periféricos, uma vez que o animal saiu da área demarcada com as quatro patas (opção de marcação no centro do animal no programa *Anymaze*).

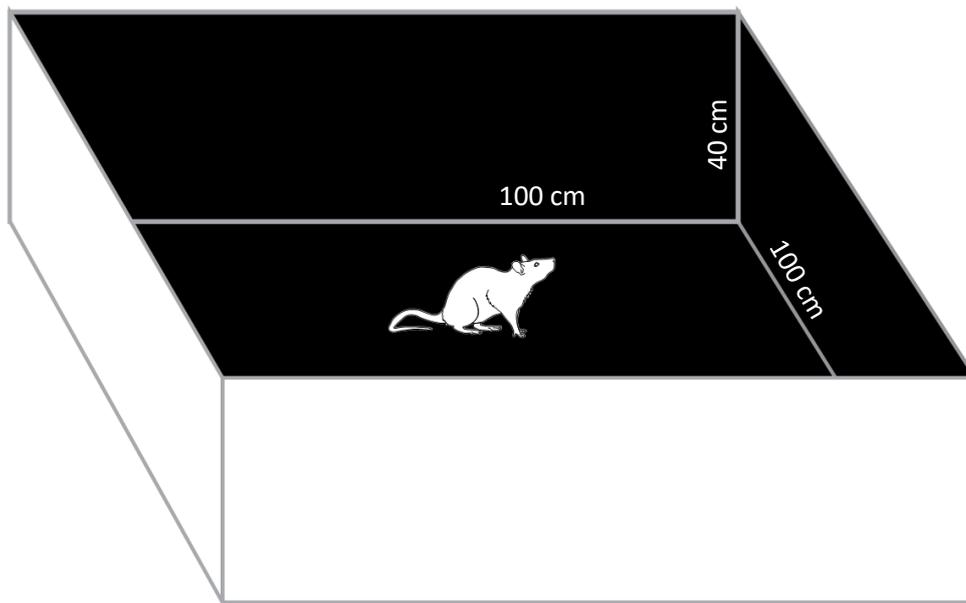


Figura 4: Arena utilizada no teste do campo aberto ilustrando o posicionamento do animal no centro do aparato no início do teste e as dimensões do aparato.

Neste estudo, foi manualmente contabilizado a frequência de *rearing*, de outro modo, a distância total percorrida e na zona central (em metros) da arena foram medidos automaticamente usando o sistema de monitoramento de vídeo ANY-maze™ versão 4.99 (Stoelting Co., USA).

Antes e depois da exposição de cada animal, o campo aberto foi limpo com papel toalha e álcool 10%.

5.4.1.2 TESTE DE DESCIDA EM VIGA VERTICAL (*POLE TEST*)

O *pole test*, descrito inicialmente por Ogawa et al. (1985), é um experimento utilizado para avaliar distúrbios de movimento, em especial a bradicinesia na qual é caracterizada pelo

um aumento na latência para a execução dos movimentos (MATSUURA et al., 1997; ANTZOULATOS et al., 2010).

No teste, o animal é confrontado com a situação de virar o corpo e descer de uma viga vertical (KARL et al., 2003). O protocolo adotado neste estudo foi modificado de Antzoulatos e colaboradores (2010) no qual um equipamento que contém uma viga vertical áspera (2 x 50 cm) apoiada em uma plataforma circular (1 cm; $r = 25$ cm), onde animais foram colocados no topo da viga, de cabeça para cima, e o objetivo foi a virada de cabeça para baixo e descida até a plataforma (Figura 5).

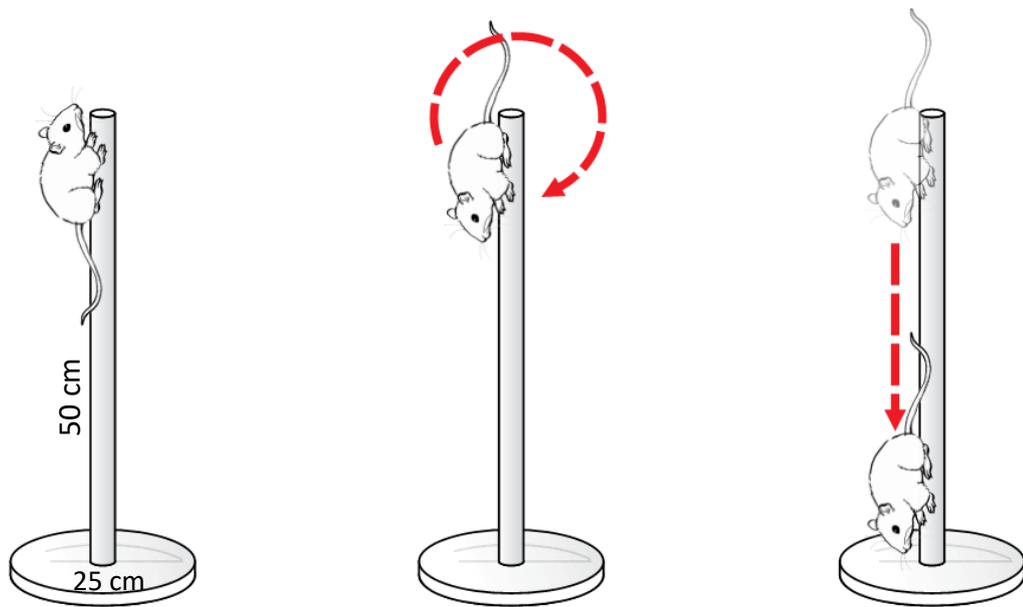


Figura 5: Ilustração do *pole test*. A primeira haste ilustra como o animal será posicionado sobre o aparelho. Na segunda, observa-se a inversão do eixo e (a terceira) a descida até a plataforma do aparato.

Durante o teste, os escores de tempo de virada e de descida dos animais na viga foram anotados ao longo de 5 ensaios, limitados a 120 segundos cada, com intervalo de 60 s entre eles. Em seguida, foi contabilizado o tempo em que os animais efetuaram corretamente a tarefa. No entanto, aos animais que não conseguiram virar deslizando na viga ou caíram da mesma, ainda que já tivessem virado de cabeça para baixo, foi atribuído o tempo máximo (120 s). A média foi calculada com os 3 melhores tempos de cada animal para tempo de virada e de descida do aparato.

Após esta avaliação, os animais seguiram para o teste de equilíbrio em vigas graduadas.

5.4.1.3 TESTE DE EQUILÍBRIO EM VIGAS GRADUADAS (*BEAM WALKING TEST-BWT*)

O BWT é utilizado para avaliar a coordenação motora e equilíbrio de roedores medindo-se a capacidade dos animais em atravessar uma série graduada de vigas estreitas até alcançar uma plataforma segura (PERRY et al., 1995; STANLEY et al., 2005).

O aparato é construído em madeira e consiste de 2 extremidades de vigas suspensas (1 m) a 50 cm do chão. Em uma extremidade situa-se o início do aparato, onde os animais foram colocados e na outra extremidade é localizada a plataforma segura, uma caixa fechada (20 cm²), para qual o animal poderia escapar. As vigas seriadas apresentaram 2 tipos de secção transversal: quadrada (28, 12 e 5 mm) e circular (28, 17 e 11 mm), e eram posicionadas entre as duas extremidades para que o animal percorresse e cumprisse a tarefa de travessia das vigas (CARTER et al., 1999; KARL et al., 2003) [Figura 6].

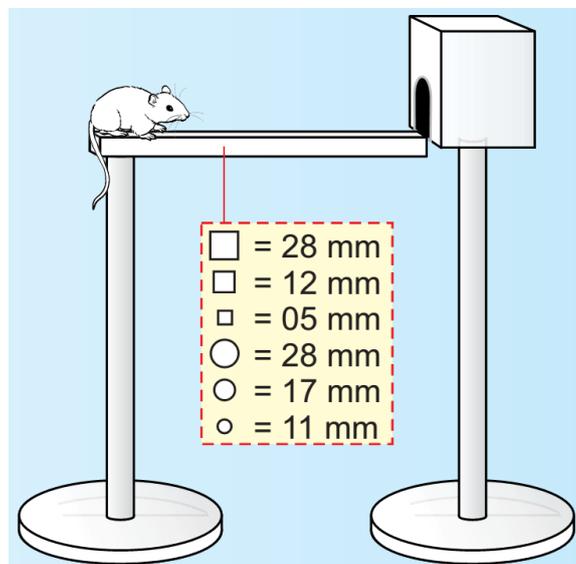


Figura 6: Desenho esquemático do *beam walking test* (BWT). Os animais foram colocados na extremidade de início com a face voltada para o aparato o qual percorreu a viga para chegar à plataforma segura (caixa fechada).

O protocolo foi modificado de Carter e colaboradores (2001) em que os animais inicialmente foram colocados na caixa fechada para ambientação e, em seguida, sobre as vigas graduadas posicionados na extremidade de início. Todos os ensaios do BWT foram iniciados posicionando os animais nas vigas quadradas e em seguida sobre as circulares, sempre da maior para a menor secção, onde o tempo máximo de travessia de uma extremidade à outra foi de 60 segundos, sendo 2 tentativas por viga, com intervalo de 60 s. Para os animais que caíssem do equipamento, a contagem era interrompida e os mesmos eram recolocados no início da viga e

continuava a contagem a partir do tempo marcado na queda, até que se completasse o tempo máximo de cada tentativa.

Neste experimento por vezes os animais pararam enquanto atravessavam as vigas, assim, as medidas de latência de travessia sobre cada uma das vigas foram consideradas difíceis de interpretar e não são relatadas neste documento. Dessa forma, foi contabilizado o número de vezes em que pelo menos uma das patas traseiras escorregou. O deslizamento de duas patas traseiras de uma só vez foi contabilizado como 2 escorregadas (CRABBE et al., 2003).

Após o término deste teste, os animais foram submetidos ao teste de locomoção forçada em cilindro giratório.

5.4.1.4 TESTE DE LOCOMOÇÃO FORÇADA EM CILINDRO GIRATÓRIO (TESTE DO ROTAROD)

O teste do Rotarod foi desenvolvido em 1968 por Jones e Roberts para avaliar coordenação motora, equilíbrio e ataxia. Usualmente ele é utilizado como um teste de avaliação de performance motora haja vista que o mesmo se fundamenta em mensurar a habilidade de roedores manterem o equilíbrio sobre um cilindro giratório movido a um motor (KARL et al., 2003). Dessa forma, a coordenação motora e equilíbrio das patas dianteiras e traseiras podem ser analisadas, de forma que para realizar esta tarefa, a função e coordenação cerebelar do animal deve estar intacta (CARTER et al., 1999).

Diante do exposto, foi utilizado um equipamento automatizado (Insight®, EFF-411), instalado em uma sala fechada e mantida à temperatura de aproximadamente 25°C. O aparelho consiste em uma caixa de acrílico com um cilindro de 8 cm de diâmetro, instalado transversalmente a aproximadamente 20 cm da base do equipamento, e mantido em rotação através de um motor. A caixa é dividida em 4 baias, de aproximadamente 10 cm de largura, permitindo a análise de 4 animais simultaneamente (Figura 7).



Figura 7: Ilustração do Rotarod.
Fonte: Insight® Brasil

Para o teste, cada animal foi colocado sobre o cilindro já em movimento, deste modo, a função motora foi quantificada cronometrando o tempo que o mesmo conseguia se equilibrar até cair (latência). O equipamento possui um sistema instalado no solo de cada baía que detecta o impacto da queda cessando automaticamente o cronômetro.

No treinamento do teste, os animais foram colocados no eixo giratório por um período de 120 segundos a 8 rotações por minuto. Caso o animal caísse, este seria reposicionado no eixo giratório quantas vezes fossem necessárias até a finalização do tempo estipulado para esta fase (120 segundos). Após o treinamento, o teste foi realizado em três exposições de 120 segundos, com intervalo de 60 segundos entre cada exposição, sendo registrado o tempo de latência, isto é, tempo de permanência do animal sobre a barra de rolagem do rotarod (adaptado de SLAMBEROVÁ et al., 2006).

5.4.2 ESTUDO DOS EFEITOS DO ETOH SOBRE O COMPORTAMENTO RELACIONADO À ANSIEDADE E MEMÓRIA

5.4.2.1 TESTE DA ATIVIDADE LOCOMOTORA ESPONTÂNEA/ CAMPO ABERTO (*OPEN FIELD*)

Conforme descrito anteriormente, o teste do *open field* também avalia parâmetros de comportamento semelhante à ansiedade (KARL et al., 2003; BAHI, 2013). Dessa forma, a distância percorrida no centro em relação à periferia do aparato foi analisada, assim como, o

número de eventos de imobilidade do animal no aparato durante o teste foi examinado como indicativo de alto grau de estresse (WALSH e CULMMINS, 1979; KARL et al., 2003).

5.4.2.2 TESTE DO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO (LCE)

O teste do LCE é um método simples de medição de comportamento semelhante à ansiedade validado em ratos (PELLOW et al., 1985) e em camundongos (LISTER, 1987) baseado exclusivamente na atividade exploratória espontânea do animal no aparato durante 5 minutos. O ensaio é fundamentado na aversão natural de roedores a espaços abertos (TREIT et al., 1993). Os índices principais do comportamento tipo ansiogênico no teste compreendem medidas espaço-temporais de esquivas dos braços abertos, enquanto a atividade locomotora é avaliada seja pelo número total de entradas nos braços ou pelo número de entradas nos braços fechados (ACEVEDO et al., 2014).

O LCE é um equipamento em madeira, na forma de cruz, elevado 50 cm do chão, com dois braços fechados (50 x 10 x 40 cm) e dois abertos (50 x 10 x 1 cm), opostos entre si (HANDLEY e MITHANI, 1984). Nos braços abertos há uma proteção de 1 cm de altura circundando-os a fim de impedir a queda dos animais do aparato.

Ao início do teste, cada animal foi posicionado no centro do LCE com a face voltada para os braços fechados e foi permitido que o animal explorasse o equipamento por 5 minutos. Um observador, o qual não teve conhecimento prévio a que grupo pertencia cada animal, realizou as anotações do número de entradas nos braços abertos e fechados do equipamento (EBA e EBF respectivamente) [Figura 8].

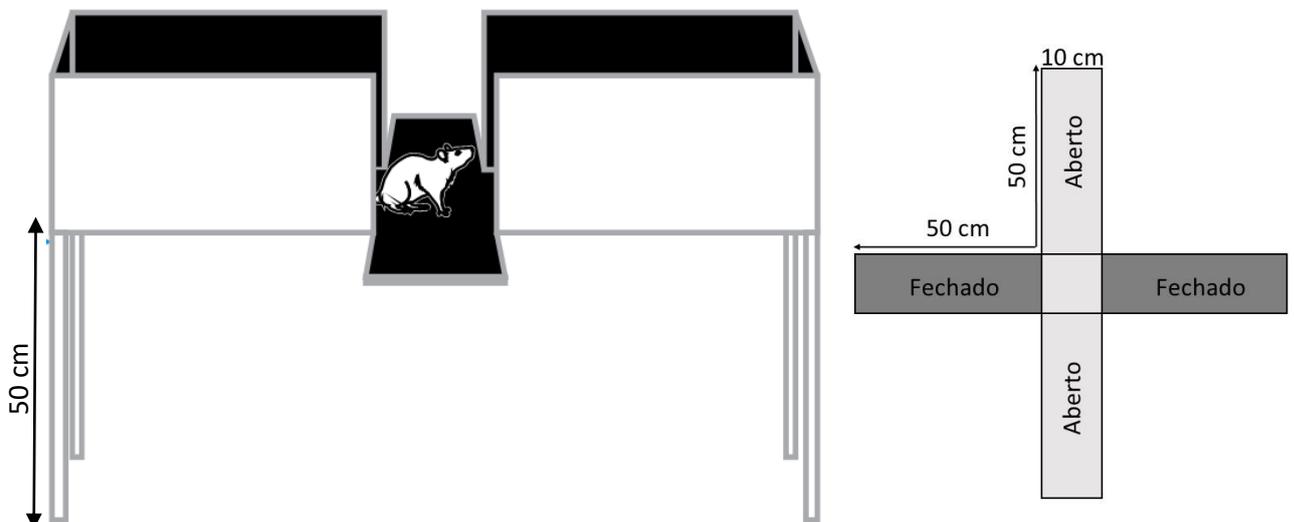


Figura 8: Diagrama esquemático do aparato do labirinto em cruz elevado (LCE) com suas respectivas dimensões. O animal é posicionado no centro do aparato com a face voltada para um dos braços fechados e aguardado o período de 5 minutos de teste.

Antes e depois da exposição de cada animal, o LCE foi limpo com solução de álcool 10% e toalhas de papel deixando-o secar e receber a circulação normal de ar.

As porcentagens de EBA (%EBA) foram calculadas em relação ao número total de entradas nos dois braços, de acordo com a fórmula: $(EBA / (EBA + EBF)) \times 100$ (PELLOW et al., 1985; PANDOLFO et al., 2007; BAHI, 2013). O efeito ansiolítico foi definido pelo aumento da %EBA, de outra forma, o efeito ansiogênico foi definido pela diminuição deste.

5.4.2.3 TAREFA DE RECONHECIMENTO DE OBJETO

Este teste foi conduzido na mesma arena de madeira utilizada para o teste de atividade locomotora espontânea e também analisado através do *software* Any-maze™ versão 4.99 (Stoelting Co., USA).

O teste de reconhecimento de objeto baseia-se no princípio de que, em um ambiente familiar, os roedores de laboratório mostram uma atração instintiva para a novidade, ou preferência por um novo objeto, não familiar (HUGHES, 2007). Esta preferência foi utilizada como um indicativo de memória em relação ao objeto familiar. O procedimento realizado foi adaptado de Pires e colaboradores (2009) o qual consiste de 3 fases: i) uma fase de habituação; ii) uma fase de treino; iii) e uma fase de teste.

A fase de habituação foi considerada o momento em que o animal explorou livremente o aparato no teste de campo aberto, sem objetos, por 5 minutos. As fases de treino e de teste duraram 3 minutos cada e tiveram intervalo de 30 minutos entre elas a fim de avaliar a memória de curta duração. Após 30 minutos da fase de habituação, previamente à fase de treino foram fixados dois objetos idênticos em formato de cubo (C1 e C2) em cantos opostos da arena, a 10 cm distantes das paredes e aproximadamente 70 cm afastados um do outro.

Antecipadamente à fase de teste, uma cópia idêntica do objeto familiarizado (C3) e um objeto novo (X) foram dispostas na arena nos mesmos locais anteriormente ocupados pelos objetos C1 e C2 da fase de treino. O novo objeto selecionado, com diferença estrutural dos cubos, em forma de “T” (T) foi utilizado para a fase de teste. Todos os objetos foram construídos com blocos de plástico Lego (São Paulo, SP, Brasil) [Figura 9].

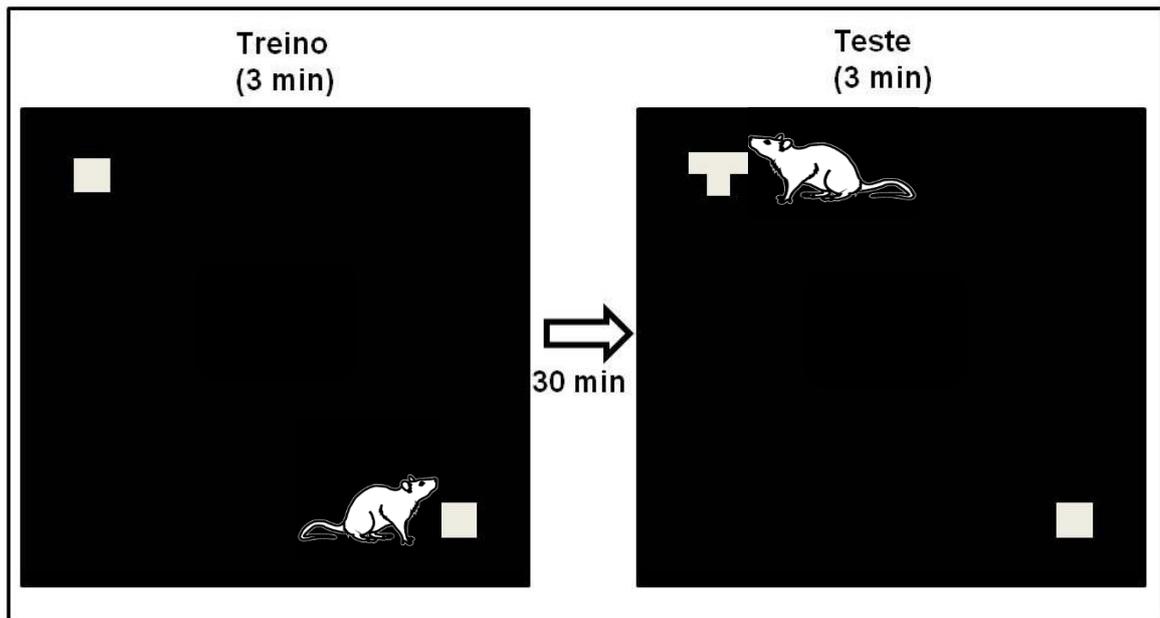


Figura 9: Ilustração do reconhecimento de objeto. A primeira imagem ilustra a fase de treino, com os dois cubos idênticos, e a segunda demonstra a fase de teste, com o objeto na forma de cubo e outra na forma de “T”.

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

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

A figura 10 demonstra o delineamento experimental adotado no estudo, o esquema dos procedimentos foi descrito a ilustração do tratamento com EtOH no padrão *binge*, ensaios comportamentais e bioquímicos (Painel A). O painel B ilustra a sequência dos ensaios

comportamentais utilizados iniciado com o teste do campo aberto e finalizado com o teste do rotarod.

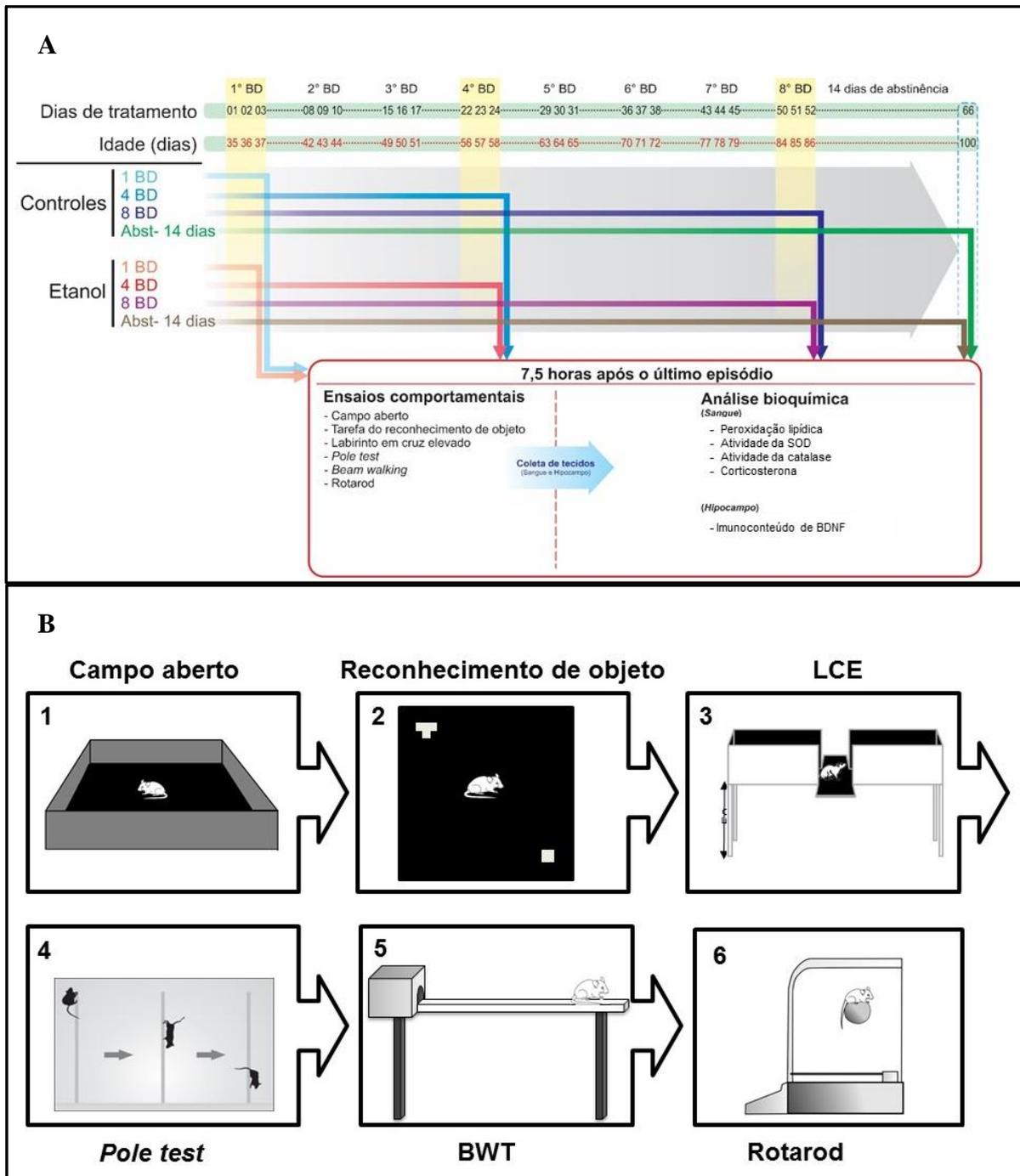


Figura 10: Delineamento experimental do estudo. Inicialmente as ratas adolescentes (35 dias de vida) receberam por gavagem água destilada ($H_2O_{dest.}$) ou etanol (EtOH) durante 3 dias consecutivos semanalmente. Este procedimento foi realizado até 8 semanas. No último grupo avaliado, após o período total de administração, deixou-se transcorrer 14 dias sem nenhuma administração. Sete horas e meia (7,5 h) após o terceiro dia de administração, os animais foram submetidos, sequencialmente, aos ensaios comportamentais: campo aberto, reconhecimento do objeto, Labirinto em Cruz Elevado (LCE), *pole test*, *beam walking test* (BWT) e rotarod. Assim, os animais foram avaliados respectivamente após 1 semana de repetidos episódios de binge drinking (1 BD), 4 semanas (4 BD) 8 semanas (8 BD), e adicionalmente, 14 dias após retirada do 8 BD (grupo analisado na 10ª semana desde o início do experimento). Em seguida, os animais foram destinados à coleta para ensaios bioquímicos.

5.5 Ensaio bioquímicos

5.5.1 COLETA DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Na manhã do dia seguinte após a bateria de testes comportamentais, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical a fim de caracterizar os efeitos bioquímicos sobre os níveis de CORT, balanço oxidativo e imunocontéudo de BDNF hipocampal após uma única sequência de repetidos episódios de *binge drinking*, por 3 dias consecutivos, na fase de adolescência ou repetidos episódios da adolescência à idade adulta, assim como, se tais efeitos perduravam após 14 dias de retirada da droga na fase adulta.

As amostras biológicas de sangue foram coletadas no período da manhã a fim de considerar o ritmo hormonal diurno de CORT (CIPPITELLI et al., 2014). O conteúdo sanguíneo foi obtido por meio de punção cardíaca intraventricular precedido de toracotomia para acesso da cavidade torácica. Em seguida, a amostra foi coletada com auxílio de seringa perfurando-se o ventrículo esquerdo e aspirando de 2 a 3 mL de sangue para realização das dosagens bioquímicas.

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

Concomitantemente, o encéfalo foi removido da caixa craniana e lavado com solução fisiológica (NaCl) 0,9% à 4°C. Em seguida, o hipocampo foi dissecado arrefecido sobre gelo seco, retirado do restante do encéfalo, congelado em nitrogênio líquido e armazenado em freezer -80°C até momento do uso para determinação do imunocontéudo de BDNF.

5.5.2 DOSAGEM DOS NÍVEIS DE CORTICOSTERONA (CORT) SANGUÍNEO

Os níveis de CORT no soro foram determinados por ensaio de imunocompetição do kit colorimétrico de ELISA (Cortisol ELISA Kit, Cayman n° 500360, Cambridge, UK) com leitura no espectro de absorbância entre 405-420 nm. Este ensaio foi baseado na competição entre CORT e o conjugado CORT-acetilcolinesterase para um número limitado de sítios de ligação ao anticorpo monoclonal de rato CORT-específico. O produto desta reação enzimática é

identificado na cor amarela e a intensidade da coloração é diretamente proporcional à quantidade de CORT ligado e inversamente proporcional à quantidade livre presente na parede durante a incubação.

O limite de detecção deste teste é de aproximadamente de 35 pg/mL de soro e a sensibilidade de ligação competitiva é de 80 pg/mL. Padrões e amostras foram feitas em duplicata, o cálculo da concentração de cada amostra foi realizado utilizando-se a equação da curva padrão traçada no ensaio.

5.5.3 ENSAIO DE IMUNODETECÇÃO DE BDNF HIPOCAMPAL POR MEIO DO MÉTODO DE *WESTERN BLOT*

5.5.3.1 PREPARAÇÃO DO HOMOGENADO

As amostras de hipocampo foram retiradas do freezer a -80°C , descongeladas e homogeneizadas manualmente (com auxílio de pistilos) em tampão dodecil sulfato de sódio 8% (SDS) composto por SDS 10%, EDTA 100mM e Tris 500mM 10% (ich.), na presença do coquetel inibidor de proteases (SIGMA-ALDRICH, St. Louis, EUA). Após a homogeneização, as amostras foram incubadas em gelo por 30 min e em seguida centrifugadas (10.000 g, 4°C , durante 10 min). O sobrenadante foi coletado sendo este o extrato celular total contendo as proteínas dissolvidas no meio, em seguida, diluído em SDS a 8%. Os extratos celulares totais foram armazenados em freezer a -20°C para uso posterior.

5.5.3.2 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS

A determinação da concentração de proteínas foi realizada utilizando o método proposto por Bradford (1976). com o auxílio de um espectrofotômetro Nanodrop® (THERMO FISHER, Waltham, EUA). Utilizou-se o comprimento de onda de 280 λ , um dos padrões de absorvância para a dosagem de proteínas, oferecidos pelo software. Após a calibração do aparelho com uma amostra de água destilada (branco), as amostras foram pipetadas e a quantidade de proteína mensurada.

5.5.3.3 ENSAIO DE IMUNODETECÇÃO POR MEIO DO MÉTODO DE *WESTERN BLOT*

Os extratos dos tecidos previamente preparados foram diluídos de modo a apresentar a mesma concentração de proteína (4 mg/ml), foram misturadas em volumes iguais ao tampão de amostra 5 vezes concentrado (Tris-HCl 150 mM (pH 6,8), β -mercaptoetanol 15%, SDS 10%,

azul de bromofenol 0,3%, glicerol 25%) e fervidas por 5 min a 100°C. Quantidades iguais de proteínas para cada amostra (30 µg) foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida e SDS 15%. A próxima etapa consistiu na transferência das proteínas contidas no gel para uma membrana de nitrocelulose (BIORAD, Hercules, EUA) sob as seguintes condições: 100 V e 30 mA durante 1 h. Após a transferência, as membranas foram saturadas em solução de TBS-T (Tris 1,2 g; NaCl 8,76 g e tween 0,05% em água destilada) contendo albumina (0,2 g/10 mL) por no mínimo 1 h, à temperatura ambiente. Após a lavagem, as membranas foram incubadas em tempo e condições apropriadas para o anticorpo primário contra a proteína do BDNF (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) (1:250). Após a incubação, as membranas foram lavadas em TBS-Tween e incubadas com anticorpo secundário específico de coelho conjugado a peroxidase (1:1000) (Cell Signaling Technology, Danvers, EUA) durante 1 hora a temperatura ambiente. Os imuno-complexos foram visualizados usando sistema de detecção de substrato quimioluminescente, os valores densitométricos foram normalizados utilizando como controle as bandas imunorreativas para a anti-β-actina (Santa Cruz, Dallas, EUA) (1:500). Sendo que o antiBDNF e a anti-β-actina apresentavam peso molecular de 14 kDa e 42 kDa respectivamente. Os filmes foram digitalizados e os níveis de proteína foram quantificados por densidade óptica utilizando o programa NIH ImageJ 1.36b (NIH, Bethesda, EUA) e os valores expressos como unidades arbitrárias em relação à β-actina.

5.5.4 AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO

5.5.4.1 DOSAGEM DE MALONDIALDEÍDO (MDA)

A dosagem de MDA foi realizada de acordo com a metodologia de Percário (2004), baseado na formação do complexo com ácido tiobarbitúrico (TBA) com MDA, TBA-MDA.

A etapa inicial consistiu em preparar aproximadamente 1000 ml de fosfato monobásico de potássio – tampão fosfato 75 mM (pH 2,5). O TBA (SIGMA®) 10 nM utilizado para formação do complexo TBA-MDA. Foi utilizado 0,144 g de TBA para 100 ml da solução de fosfato monobásico de potássio, terminando a dissolução completa (PERCÁRIO et al., 1994). Foi preparada a solução padrão de MDA (1,1,3,3-tetrahidroxipropano, SIGMA®) 20 µM a partir de uma solução de 400 µM/L, diluindo esta solução em 100 ml de água destilada.

Após as soluções prontas, iniciou-se 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 µl de água destilada 500 µl de solução padrão de MDA 20 µM. Por fim, os tubos em diante receberam 500 µl das amostras de soro. 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 uma hora de banho-maria, as amostras foram resfriadas em temperatura ambiente durante 15 minutos. Observou-se nesta fase a coloração de tonalidade rósea proporcional a 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. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 2500 rpm por 10 minutos e o sobrenadante pipetado para a cubeta e lido em espectrofotômetro calibrado em 535 nm e zerado com o tubo controle branco.

O cálculo para o valor de MDA da amostra foi obtido pelo emprego da seguinte fórmula com os resultados expressos em ng/ml: $MDA = \text{Absorbância das amostras} \times (10 \times 440,61 / \text{Absorbância padrão MDA})$.

5.5.4.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA CATALASE

A determinação da atividade da catalase foi realizada de acordo com a metodologia de Aebi (1984), modificado por Bukowska e Kowalska (2004).

Inicialmente, as amostras de sangue total foram preparadas para análise, uma alíquota da amostra foi retirada e foram hemolisadas com adição de água gelada (1:3), em seguida, foram diluídas com solução tampão TRIS base (Tampão Tris 1 M / EDTA 5mM pH8,0).

A verificação da atividade da catalase foi realizada pela medida da taxa de decaimento de H₂O₂. Para isso, preparou-se a solução de reação de H₂O₂ a 30%, em seguida, retirou-se 5 mL desta solução e foi adicionando 2,5 mL da solução TRIS base e 2 mL de água ultrapura, deixando em banho-maria (37°C) durante 15 minutos.

Posteriormente, foi realizada a leitura em comprimento de onda de 240 nm a 25°C, durante 60 segundos. Para calcular a atividade de catalase foi utilizada a equação: $(2,3/\Delta t) \times (a/b) \times (\text{Log } a_1/a_2)$, onde Δt é a variação do tempo da reação (60s), a é o volume do hemolisado na cubeta, b é a concentração de proteínas totais da amostra em g/dL, a_1 é o valor da absorbância no tempo 0 ($t=0s$) e a_2 é o valor da absorbância no tempo final ($t=60s$). Os resultados finais foram expressos em k/gProt/min.

5.5.4.3 DOSAGEM DE PROTEÍNAS TOTAIS NO HEMOLISADO

A quantidade de proteínas contidas nas amostras foi obtida a partir do método do biureto modificado (WEICHSELBAUM, 1946) e usado o kit comercial para proteínas totais da Doles® nos valores finais de catalase.

Este método do reagente de biureto modificado baseia-se em uma reação com formação de cor com as proteínas. A solução biureto é composta por citrato trissódico 0,114M, carbonato de sódio 0,21 M e sulfato de cobre 0,01 M.

Para o preparo dos tubos de ensaio em que foram preparadas as amostras, o branco e o padrão, foi adicionado o reagente de biureto (solução de uso) em todos os tubos, em seguida, 50 µL da amostra, com exceção dos tubos branco e padrão. Por conseguinte, foi adicionado 50 µL da solução padrão (4 g/dL) nos tubos padrões. Nos tubos brancos não foram adicionadas amostra nem solução padrão. Em todos os tubos de ensaios, foram adicionadas 2 gotas de hidróxido de sódio 6 M. Em seguida, os tubos foram homogeneizados e deixados em repouso durante cinco minutos, à temperatura ambiente (20-30°C). Por conseguinte, foram adicionadas aos poços da placa de leitura de ELISA e realizadas as leituras, comprimento de onda em 550nm ou filtro verde, acertando o zero com o branco.

O cálculo de proteínas totais foi realizado de acordo com a fórmula: Proteínas totais = (Absorbância teste/Absorbância padrão) x4. Os valores finais foram expressos em g/dL.

5.5.4.4. DOSAGEM DE ATIVIDADE DA ENZIMA SUPERÓXIDO-DISMUTASE (SOD)

A metodologia de dosagem a atividade da enzima superóxido-dismutase (SOD) foi feita de acordo com McCord e Fridovich (1969), que consiste na determinação enzimática da SOD por competição com a enzima xantina oxidase (XOD) pelo radical superóxido.

Foram utilizadas as seguintes soluções: solução de tampão fosfato de potássio 49,3 mg/mL, solução de EDTA a 4 mg/mL, solução de citocromo C à 1,1 mM, solução de xantina de 1,64 mg em 90 ml de água ultrapura adicionado 1N de KOH. Após a fabricação de todas as soluções, os reagentes foram misturados nas seguintes proporções: água ultrapura (23 mL); reagente tampão fosfato de potássio (25 mL); reagente EDTA (1,0 mL); reagente citocromo C (1,0 mL); solução de xantina (50 mL). Após mistura, todas as soluções foram ajustadas o pH para 7,8, formando a solução de coquetel.

As amostras foram preparadas para a leitura, em que foram retirados 100 µL e adicionados 400 µL de água gelada para promover hemólise. As cubetas foram preparadas para a leitura em espectrofotômetro Spectra MAX 250 (Molecular Devices, Union City, CA, USA) com comprimento de onda 550nm, no tempo de 5 minutos, os valores de absorbância foram anotados do tempo 0 (T0) e tempo 5 (T5). O T0 foi anotado antes da adição do reagente XOD, em seguida foi adicionado o XOD e contados 5 minutos para verificar como final de reação (T5).

Os resultados foram calculados a partir das seguintes fórmulas:

$$\% \text{ inibição} = \frac{(\Delta A_{550\text{nm}}/\text{min Não inibido} - \Delta A_{550\text{nm}}/\text{min Teste}) \times (100)}{(\Delta A_{550\text{nm}}/\text{min Não inibido} - \Delta A_{550\text{nm}}/\text{min Branco})}$$

Em seguida:

$$\text{Enzima (Unidades/mL)} = \frac{(\% \text{ inibição}) \times (\text{Fator de diluição})}{(50\%) \times (0,10)}$$

Onde: 50% é a taxa de redução do Citocromo C por definição de unidade; e 0,10 o volume em mililitros da amostra usada em cada teste. Os resultados finais foram expressos em Unidades/mL.

5.6 Análise estatística

Os dados obtidos foram expressos como média \pm erro padrão da média (e.p.m.) de 10 animais por grupo para os testes comportamentais e de 4-5 animais por grupo para análises bioquímicas. Inicialmente foi verificado a normalidade dos grupos pelo método de Kolmogorov-Smirnov.

Para o ganho de peso corporal entre os animais dos grupos controle e EtOH, assim como, para o teste do rotarod a comparação estatística foi performada utilizando-se Análise de Variância (ANOVA) de duas vias (fator tratamento vs. fator episódios de BD) com medidas repetidas (dias semanais ou número de exposições ao aparato rotarod) seguido do teste Bonferroni. A análise estatística da alcoolemia foi realizada pelo teste t de Student (60 vs. 450 minutos após o BD). Para todos os demais dados, a comparação estatística foi performada com ANOVA de duas vias com fator tratamento (água vs. EtOH) e fator episódios de *binge drinking* (1 BD vs. 4 BD vs. 8 BD vs. Abstinência-14 dias).

Após encontrar valores significantes para a ANOVA, foram realizadas comparações múltiplas utilizando o teste de Fisher-LSD. Em todos os casos, o nível aceito de significância foi de $p < 0,05$. Além disso, foi performado análise de correlação de Pearson entre os dados de imunoconteúdo de BDNF hipocampal com o índice de discriminação na tarefa de reconhecimento de objeto.

VI RESULTADOS

6. RESULTADOS

6.1 Repetidos episódios da administração intermitente de EtOH (3 g/kg/dia) não altera o peso corporal de ratas da adolescência à fase adulta

O efeito da administração de EtOH (3 g/kg/dia) intermitente e episódico sobre o ganho de peso dos animais é ilustrado na figura 11. ANOVA de duas vias com medidas repetidas revelou efeitos significantes para o fator tratamento ($F_1 = 11,85$; $p = 0,0006$) e para o fator repetição ($F_9 = 254,5$; $p < 0,0001$) mas não para o fator de interação entre tratamento e repetição ($F_9 = 0,4594$; $p = 0,9015$). Comparação subsequente usando teste de Bonferroni revelou que o EtOH não altera o ganho de peso corporal de ratas fêmeas da adolescência à fase adulta, durante o período do experimento, independentemente do número de episódios de *binge drinking* na dose utilizada.

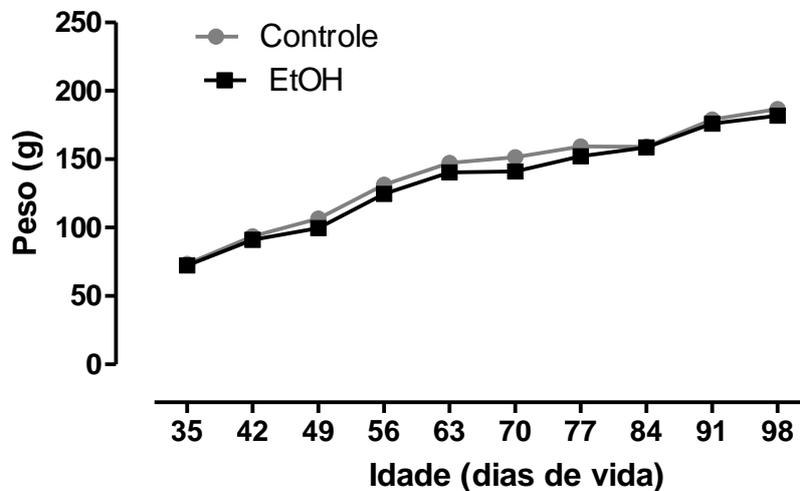


Figura 11: Efeitos da administração de etanol (EtOH) em forma de *binge drinking* sobre o ganho de peso de ratas na fase de adolescência à fase adulta. Os resultados estão expressos como a média \pm e.p.m do número total de animais pesados semanalmente a partir do 35° DPN até o 98° DPN, conforme a permanência no biotério de acordo com o período determinado por seu respectivo grupo de análise (n=10-40; ANOVA de duas vias com medidas repetidas).

6.2 Concentração de EtOH sanguíneo após repetidos episódios de *binge drinking* por 3 dias consecutivos na fase de adolescência

A mensuração da alcoolemia no período de 60 minutos após a última dose de EtOH numa sessão do modelo *binge* utilizado (3 dias consecutivos) foi de $197,4 \pm 19,46$ mg/dL, este nível alcoólico reflete a ocorrência do *binge drinking* definido pelo NIAAA cujo nível sanguíneo de álcool no sangue deve exceder 80 mg/dL (NIAAA, 2004). Além disso, a

quantidade mensurada no período de 450 min após a última administração da droga foi de $0,75 \pm 0,48$ mg/dL no sangue. Teste t de Student revelou que 7,5 h após a administração de EtOH por três dias consecutivos reduziu a concentração alcoólica ($0,74 \pm 0,4$ mg/dL; $p < 0,0001$) comparado ao tempo de 60 min após o *binge drinking* (Figura 12).

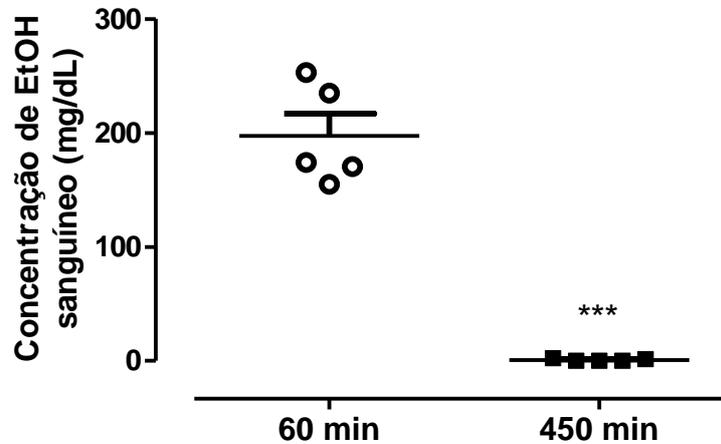


Figura 12: Dosagem da concentração de etanol (EtOH) em forma de *binge drinking* (3 dias consecutivos) no sangue de ratas na fase de adolescência. Os resultados estão expressos como a média \pm e.p.m da alcoolemia em mg/dL no período de 60 minutos e 450 minutos após 3 dias consecutivos de *binge* de EtOH ($n = 5$; Teste t de Student). *** $P < 0,0001$

6.3 Efeitos após a administração de EtOH no padrão *binge* da adolescência à fase adulta sobre o comportamento motor

6.3.1 ADMINISTRAÇÃO DE ETOH NO PADRÃO *BINGE* PROVOCA REDUÇÃO DA ATIVIDADE LOCOMOTORA ESPONTÂNEA EM RATAS POR TEMPO PROLONGADO

O efeito da administração de EtOH (3 g/kg/dia) intermitente e episódico gerou redução da atividade locomotora espontânea de ratas *Wistar* identificado no teste do campo aberto por meio dos parâmetros distância total percorrida (exploração horizontal) e número de levantamentos exploratórios (*rearings*, exploração vertical) [Figura 13].

ANOVA de duas vias revelou efeito significativo para o fator tratamento ($F_1 = 32,06$; $p < 0,001$) mas não para os fatores repetição ($F_3 = 0,49$; $p = 0,68$) e interação entre tratamento e repetição ($F_3 = 1,98$; $p = 0,11$) na distância total percorrida. Comparação subsequente usando teste de Fisher-LSD revelou que o EtOH reduz a distância total percorrida (em metros) dos animais independentemente do número de episódios de *binge* desde a adolescência até a idade

adulta ($p < 0,001$ para 1 BD; $p = 0,03$ para 4 e 8 BD), assim como, a permanência do prejuízo por tempo prolongado após os repetidos episódios da administração de EtOH ($p = 0,03$) [Figura 13 A].

Análise com ANOVA de duas vias realizada para o número de levantamentos exploratórios revelou efeito significativo para o fator tratamento ($F_1 = 36,15$; $p < 0,001$) mas não para os fatores repetição ($F_3 = 2,47$; $p = 0,06$) e interação entre tratamento e repetição ($F_3 = 0,39$; $p = 0,76$). Teste de Fisher-LSD realizado, por conseguinte, demonstrou que o *binge drinking* da adolescência à fase adulta gera redução prolongada da atividade exploratória vertical de ratos fêmeas (4 BD, $p = 0,002$; 8 BD, $p = 0,03$; e, Abs-14 dias, $p = 0,007$), sendo encontrado este efeito mais pronunciado em uma sequência de *binge* na fase da puberdade quando comparado a seu respectivo controle (1 BD, $p < 0,001$) [Figura 13 B].

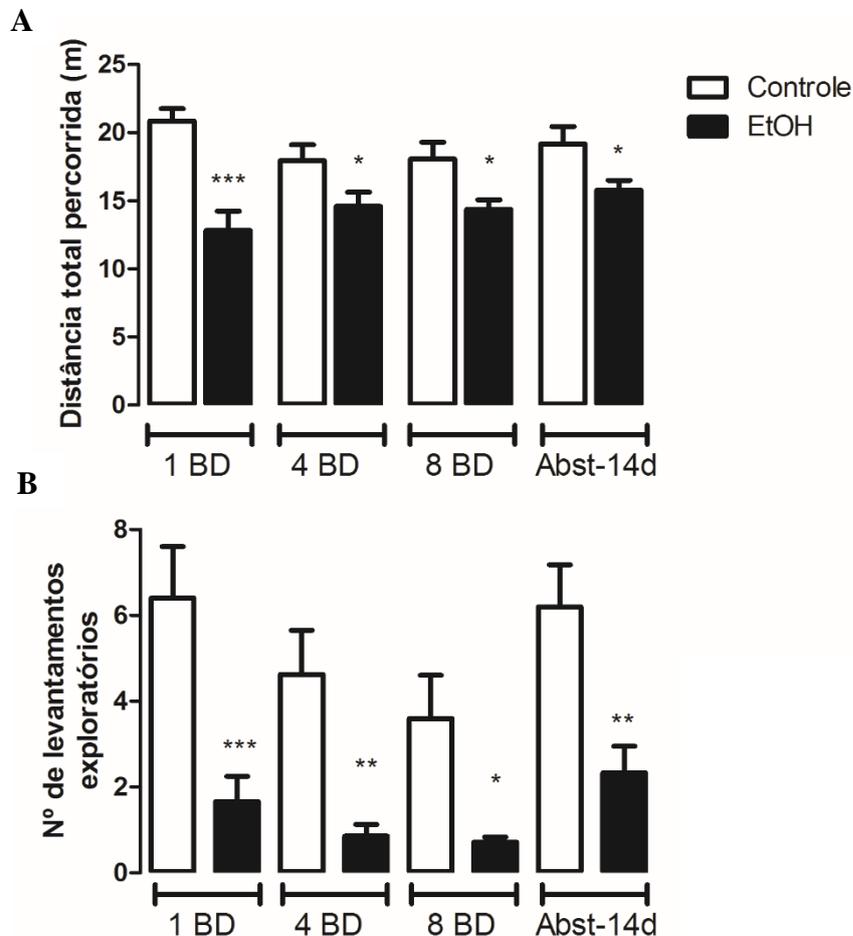


Figura 13: Efeitos da administração de etanol (EtOH) em forma de *binge drinking* sobre a atividade locomotora espontânea de ratas na fase de adolescência à fase adulta por meio dos parâmetros distância total percorrida (painel A) e número de levantamentos exploratórios (painel B). Os resultados estão expressos como a média \pm e.p.m da distância total percorrida e da frequência de *rearings*, durante 300 segundos, com 10 animais por grupo (ANOVA de duas vias, teste Fisher-LSD subsequente). * $p < 0,05$ comparado ao respectivo grupo controle; ** $p < 0,01$ comparado ao respectivo grupo controle; *** $p < 0,001$ comparado ao respectivo grupo controle.

6.3.2 ETOH NO PADRÃO *BINGE* GERA OCORRÊNCIA DE BRADICINESIA EM RATAS DA ADOLESCÊNCIA À IDADE ADULTA

A figura 14 ilustra o desempenho de ratas adolescentes tratadas com H₂O_{dest.} ou EtOH, na forma de *binge drinking*, no *pole test*.

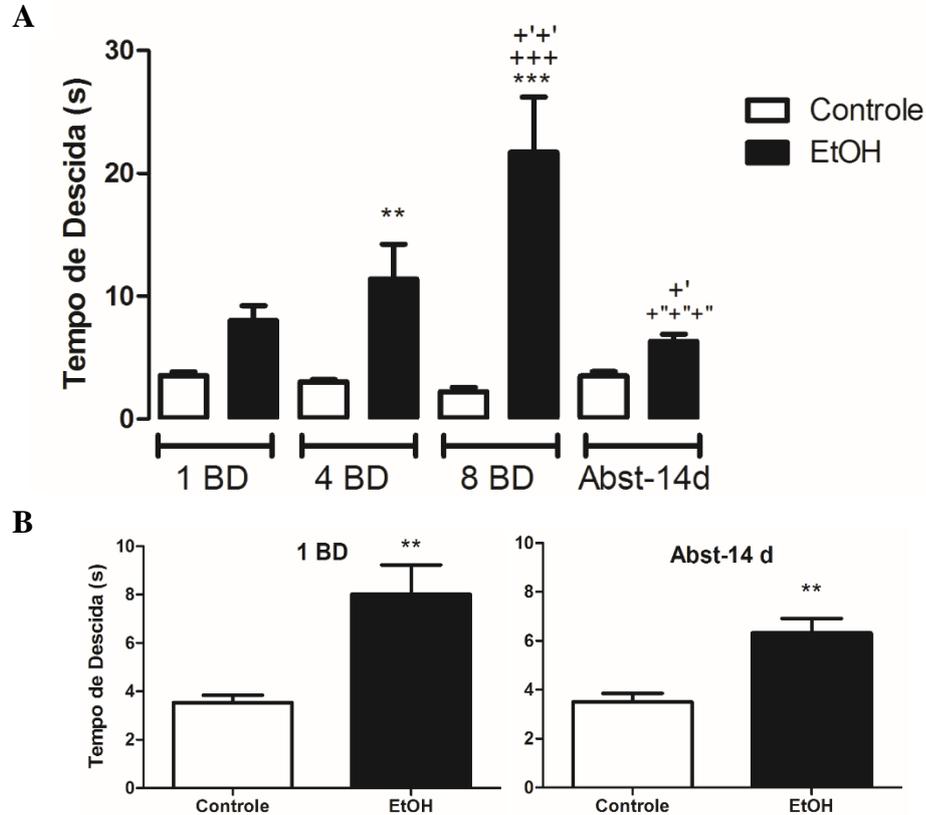


Figura 14: Efeito do etanol (EtOH) em forma de *binge drinking* na determinação do controle de movimento e avaliação do desenvolvimento de bradicinesia em ratas na fase de adolescência à fase adulta por meio da média dos 3 melhores ensaios no tempo de descida em segundos até a base da plataforma. Os resultados estão expressos como a média \pm e.p.m, no período máximo de 120 segundos/ensaio, com 10 animais por grupo. Painel A: ANOVA de duas vias, teste Fisher-LSD subsequente; painel B: teste t de Student para avaliação do período 1 BD e Abst- 14 dias. * $p < 0,05$ comparado ao respectivo grupo controle; ** $p < 0,01$ comparado ao respectivo grupo controle; *** $p < 0,001$ comparado ao respectivo grupo controle; +++ $p < 0,001$ comparado ao grupo EtOH- 1 BD; +' $p < 0,05$ comparado ao grupo EtOH- 4 BD; ++' $p < 0,01$ comparado ao grupo EtOH- 4 BD; ++++' $p < 0,001$ comparado ao grupo EtOH- 8 BD.

ANOVA de duas vias revelou efeitos significantes para os principais fatores (tratamento: $F_1 = 30,98$; $p < 0,001$; repetidos episódios de *binge*: $F_3 = 2,84$; $p = 0,04$) e para a interação entre eles ($F_3 = 4,23$; $p = 0,007$). Comparação com teste de Fisher-LSD subsequente mostrou aumento significativo no tempo de descida até chegar na base da plataforma entre o grupo controle e o grupo intoxicado após 4 ($p = 0,004$) e 8 ($p < 0,001$) semanas de repetidos

episódios de *binge drinking* a partir da média dos três melhores ensaios de cada animal (Figura 14 A).

Além disso, a intoxicação com EtOH da adolescência à fase adulta durante o período de 8 semanas de administração em *binge* gerou bradicinesia de forma mais intensa que os demais períodos de administração deste padrão de ingestão ($p < 0,001$ e $p = 0,002$ para 1 BD e 4 BD respectivamente), assim como, houve uma recuperação parcial da intensa hipocinesia dos movimentos das ratas adultas após um período de retirada da droga ($p < 0,001$) [Figura 14 A].

Por conseguinte, teste t de Student revelou ocorrência de bradicinesia nos animais intoxicados com EtOH no período de 1 BD ($t = 3,19$; $p = 0,004$), assim como, 14 dias ($t = 3,32$; $p = 0,004$) após a retirada do toxicante pelo aumento no tempo de descida até chegar na base da plataforma do *pole test* (Figura 14 B).

6.3.3 ADMINISTRAÇÃO DE ETOH NO PADRÃO *BINGE* GERA PREJUÍZO NA COORDENAÇÃO MOTORA E EQUILÍBRIO DE RATAS POR TEMPO PROLONGADO

A figura 15 demonstra o desempenho de ratas adolescentes tratadas com H₂O_{dest.} ou EtOH, na forma de *binge drinking*, sobre vigas graduadas de transecções quadrada e circular no BWT. Ao analisar o número de escorregadas durante a travessia dos animais ao caminhar sobre a viga quadrada de maior espessura da extremidade de início até alcançar a plataforma segura, ANOVA de duas vias revelou efeito significativo somente para o fator repetição de episódios de *binge drinking* ($F_3 = 9,49$; $p < 0,001$). Por conseguinte, comparação com teste de Fisher-LSD revelou diferença no número de escorregadas de animais controle ou intoxicados na fase adulta (100 DPN) em relação aos mais jovens (37 e 58 DPN, controle: $p = 0,02$ e $p < 0,001$; EtOH: $p = 0,02$ e $p < 0,001$ respectivamente) [Figura 15 A].

ANOVA de duas vias não identificou variância entre os principais fatores (tratamento: $F_1 = 1,53$; $p = 0,22$; repetidos episódios de *binge*: $F_3 = 1,60$; $p = 0,19$) e para a interação entre eles ($F_3 = 0,23$; $p = 0,87$) no número de escorregadas durante a travessia dos animais ao caminhar sobre a viga quadrada de espessura média (12 mm), conseqüentemente, foi excluído qualquer possibilidade de diferença entre as amostras dos animais controle ou intoxicados com EtOH no padrão *binge* (Figura 15 B).

Ao avaliar a travessia de ratas *Wistar* sobre a viga quadrada de menor espessura (5 mm), ANOVA de duas vias revelou diferença somente no fator tratamento ($F_1 = 28,53$; $p < 0,001$),

não revelando diferença no fator repetição dos episódios nem na interação entre os dois fatores principais ($F_3 = 1,60$; $p = 0,19$ e $F_3 = 0,37$; $p = 0,77$ respectivamente). Comparação com teste de Fisher-LSD subsequente mostrou aumento significativo do número de escorregadas por todos os animais pós-intoxicação com EtOH durante a passagem sobre a viga ($p = 0,04$; $p = 0,01$; $p = 0,01$; $p < 0,001$ para os períodos de 1 BD, 4 BD, 8 BD e Abs- 14 dias respectivamente). No entanto, o prejuízo na coordenação motora e equilíbrio após o período de 14 dias de retirada da droga nos animais adultos foi maior que a intoxicação com *binge drinking* agudo na adolescência ($p = 0,03$) [Figura 15 C].

A respeito da travessia dos animais sobre a viga circular de maior espessura (28 mm), ANOVA de duas vias revelou efeitos significantes para os principais fatores (tratamento: $F_1 = 4,39$; $p < 0,03$; repetidos episódios de *binge*: $F_3 = 7,79$; $p < 0,001$) e para a interação entre eles ($F_3 = 4,27$; $p = 0,006$). Por conseguinte, comparação com teste de Fisher-LSD revelou aumento significativo do número de escorregadas na travessia da viga entre o grupo controle e o grupo intoxicado após 4 semanas de repetidos episódios de *binge drinking* ($p < 0,001$). Além disso, foi demonstrado que a intoxicação durante 4 semanas de EtOH intermitente e episódico durante a adolescência provocou maior número de escorregadas na travessia sobre a viga em relação aos demais períodos pós-intoxicação ($p < 0,001$; para 1 BD, 8 BD e Abst- 14 dias) [Figura 15 D].

A avaliação da travessia dos animais na viga circular de espessura média (17 mm) foi semelhante aos achados na viga circular de maior diâmetro, no qual ANOVA de duas vias revelou efeitos significantes para os principais fatores (tratamento: $F_1 = 5,69$; $p < 0,01$; repetidos episódios de *binge*: $F_3 = 2,33$; $p = 0,07$) e para a interação entre eles ($F_3 = 4,38$; $p = 0,006$). Comparação subsequente com teste de Fisher-LSD revelou aumento significativo do número de escorregadas na travessia da viga entre o grupo controle e o grupo intoxicado após 4 semanas de repetidos episódios de *binge drinking* ($p < 0,001$), assim como, também foi demonstrado nesta viga que a intoxicação durante 4 semanas de EtOH intermitente e episódico durante a adolescência provocou maior número de escorregadas na travessia em relação aos demais períodos de intoxicação ($p < 0,001$; para 1 BD e 8 BD) e ($p = 0,01$; para o períodos de Abst- 14 dias) [Figura 15 E].

Análise com ANOVA de duas vias realizada para o número de escorregadas durante a travessia na viga de maior dificuldade, circular de menor diâmetro, revelou efeito significativo para o fator tratamento ($F_1 = 25,67$; $p < 0,001$) e fator repetição ($F_3 = 3,36$; $p = 0,02$) mas não para interação entre tratamento e repetição ($F_3 = 0,61$; $p = 0,60$). Teste de Fisher-LSD realizado,

por conseguinte, demonstrou que o *binge drinking* em ratos fêmeas da adolescência à fase adulta gera aumento do número de escorregadas por período prolongado (4 BD, $p < 0,001$; 8 BD, $p = 0,04$; e, Abs-14 dias, $p = 0,004$), sendo encontrado este efeito em uma semana de repetidos *binges* de EtOH (3 dias consecutivos) na fase da puberdade revelado por teste t de Student (1 BD: $t = 3,13$; $p = 0,008$) [Figura 15 F].

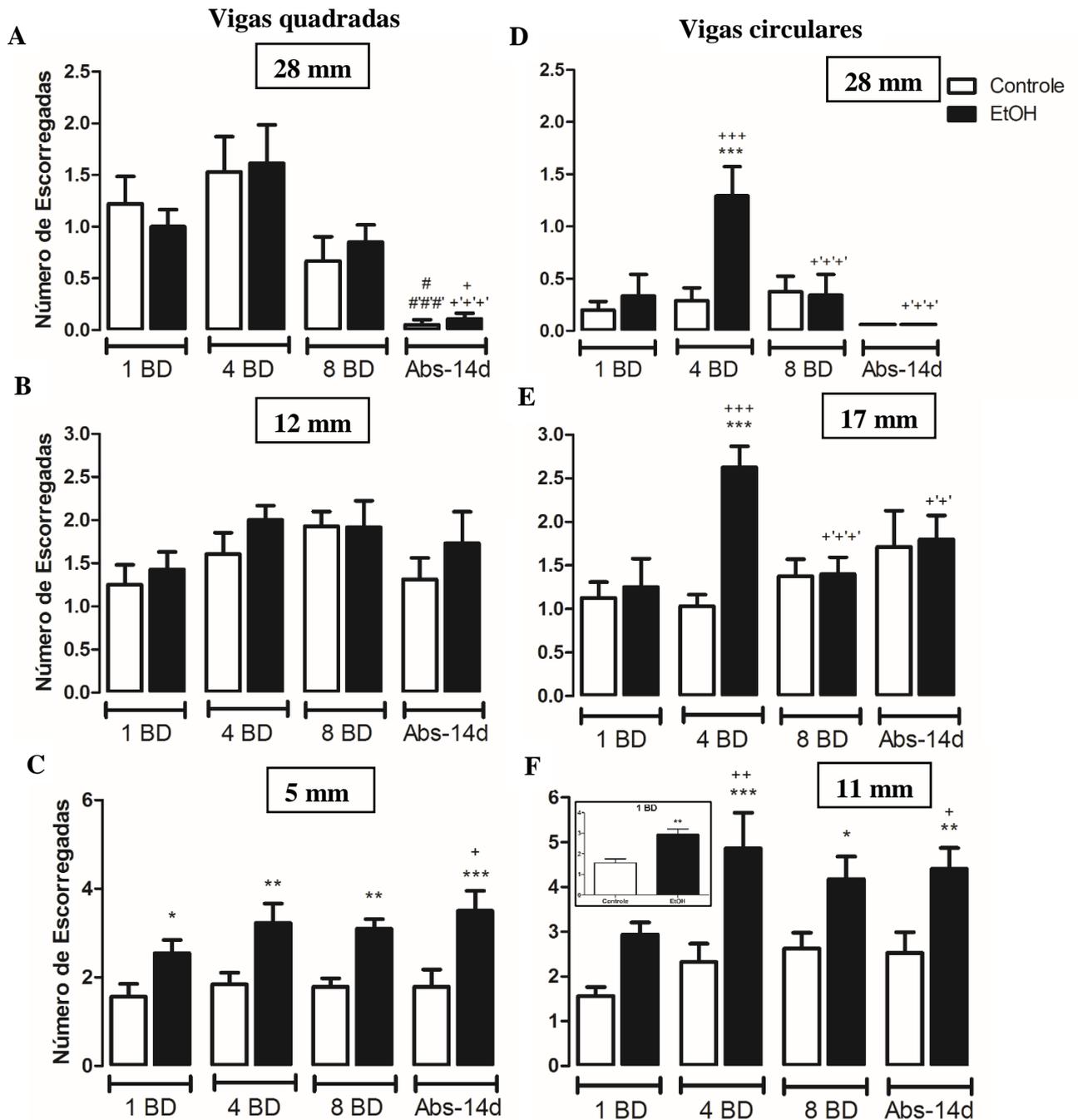


Figura 15: Efeitos da administração de etanol (EtOH) em forma de *binge drinking* sobre o número de escorregadas de ratas na fase de adolescência à fase adulta ao atravessar vigas graduadas. Os resultados estão expressos como a média \pm e.p.m do número de escorregadas sobre vigas quadradas (Painéis A, B e C) e circulares (Painéis D, E e F), no Beam Walking Test (BWT), no período máximo de 120 segundos, com 10 animais por grupo (ANOVA de duas vias, teste Fisher-LSD subsequente). No painel F, teste t de Student para avaliação do período 1 BD. * $p < 0,05$ comparado ao respectivo grupo controle; ** $p < 0,01$ comparado ao respectivo grupo controle; *** $p < 0,001$ comparado ao respectivo grupo controle; # $p < 0,05$ comparado ao grupo controle 1 BD; ### $p < 0,001$ comparado ao grupo controle 4 BD; + $p < 0,05$ comparado ao grupo EtOH- 1 BD; +++ $p < 0,001$ comparado ao grupo EtOH- 1 BD; ++ $p < 0,01$ comparado ao grupo EtOH- 4 BD; ++++ $p < 0,001$ comparado ao grupo EtOH- 4 BD.

No teste do rotarod os grupos experimentais foram expostos quatro vezes ao cilindro giratório, com um intervalo de 60 segundos entre as exposições. A primeira exposição consistiu na adaptação dos animais ao aparato e, em seguida, o teste foi realizado nas três exposições seguintes avaliando-se a coordenação motora dos animais por meio do parâmetro tempo de permanência (latência) sobre o cilindro giratório até a primeira queda (adaptado de SLAMBEROVÁ et al., 2006).

O efeito da administração de EtOH (3 g/kg/dia) intermitente e episódico em ratas *Wistar* sobre o tempo de latência, em segundos, nas três exposições ao aparato rotarod é ilustrado na figura 16. ANOVA de duas vias com medidas repetidas revelou efeitos significantes para os principais fatores (fator tratamento: $F_7 = 9,69$; $p < 0,0001$; fator repetição: $F_2 = 12,59$; $p < 0,0001$) mas não para a interação entre tratamento e repetição ($F_{14} = 1,40$; $P = 0,14$).

Comparação subsequente usando teste de Bonferroni revelou que o EtOH no protocolo *binge* agudo em ratas fêmeas na fase de adolescência reduz o tempo de permanência destes animais sobre o cilindro giratório na primeira fase do teste comparado ao grupo controle ($p < 0,01$). No entanto, as ratas adolescentes intoxicadas com EtOH melhoraram seu desempenho nas demais etapas do teste aproximando-se aos tempos de permanência sobre o cilindro do grupo controle ($p > 0,05$).

Vale ressaltar que repetidos episódios de *binge drinking* durante a adolescência gera maior prejuízo na coordenação motora e equilíbrio identificado pela redução do tempo de permanência dos animais sobre a barra giratória em todas as três fases do teste do rotarod ($p < 0,05$).

No entanto, foi observado que a continuidade da administração de EtOH no padrão *binge* na fase adulta gera uma pequena adaptação e atenuação do dano em relação ao aprendizado motor dos animais identificada pela redução da latência no tempo de permanência até a primeira queda do rotoarod somente nas duas primeiras fases do teste ($p < 0,01$ e $p < 0,05$; primeira e segunda fase respectivamente). Além disso, o tempo de permanência dos animais intoxicados após 8 BD sobre o cilindro giratório foi maior que os animais da administração de 4 semanas de *binge drinking* na terceira exposição ao aparato no teste do rotarod ($p < 0,05$).

Todavia, mesmo após um período prolongado de retirada da droga os animais que consumiram EtOH permaneceram com redução da latência no tempo de permanência no aparato do rotarod até ocorrer a primeira queda na primeira fase de teste ($p < 0,05$). Contudo, o tempo de permanência dos animais abstêmios sobre a barra giratória na primeira exposição ao

aparato ainda foi maior que a latência encontrada pelos animais intoxicados durante 8 semanas ($p < 0,05$).

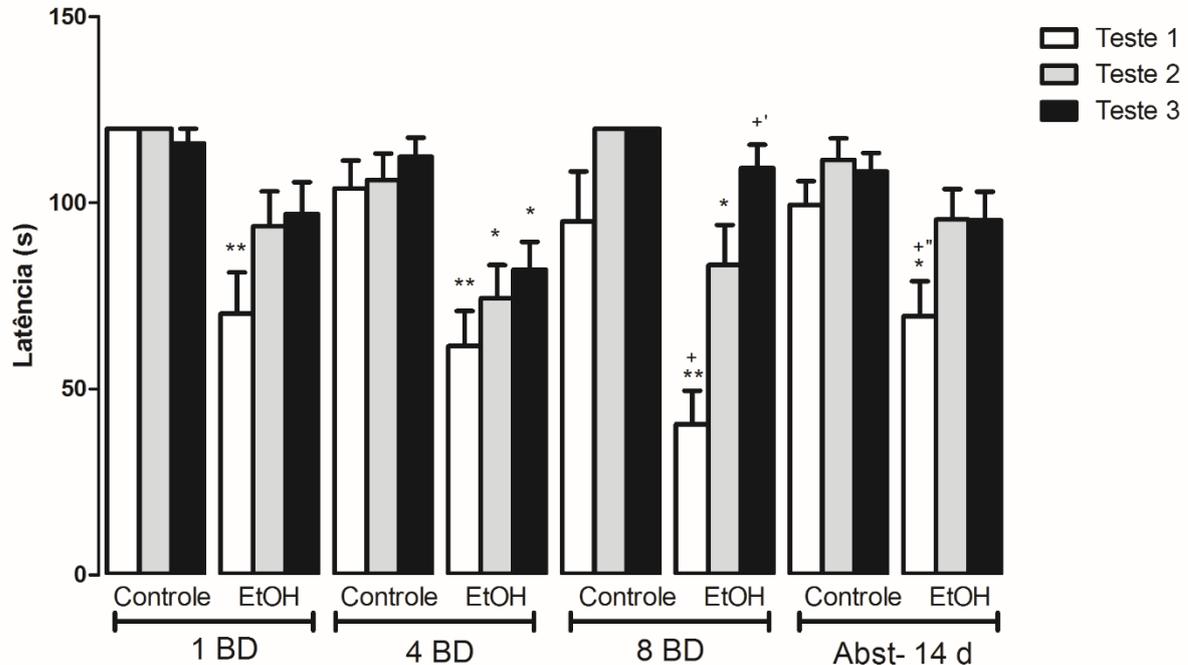


Figura 16: Efeitos da administração de etanol (EtOH) em forma de *binge drinking* sobre a coordenação motora de ratas na fase de adolescência à idade adulta avaliadas pelo tempo de permanência sobre o cilindro giratório no teste do rotarod. Os resultados estão expressos como a média \pm e.p.m da latência, em segundos, da primeira queda no aparato do rotarod em três fases do teste, no período máximo de 120 segundos, com 10 animais por grupo (ANOVA de duas vias com medidas repetidas, teste de Bonferroni subsequente). * $p < 0,05$ comparado ao respectivo grupo controle; ** $p < 0,01$ comparado ao respectivo grupo controle; + $p < 0,05$ comparado ao grupo EtOH- 1 BD; +' $p < 0,05$ comparado ao grupo EtOH- 4 BD; +'' $p < 0,05$ comparado ao grupo EtOH- 8 BD.

6.4 Repetidos episódios de *binge drinking* da adolescência à fase adulta geram comportamento semelhante à ansiedade

A figura 17 ilustra o efeito da administração episódico e intermitente de EtOH em ratas da adolescência à fase adulta sobre o comportamento semelhante à ansiedade nos testes do campo aberto e LCE.

A comparação da atividade locomotora no centro do campo aberto em relação à periferia indica comportamento semelhante à ansiedade, uma vez que roedores têm aversão natural à espaços abertos (KARL et al., 2003). ANOVA de duas vias (tratamento vs. repetição de episódios de BD) revelou efeitos significativos sobre a distância percorrida na área central para os fatores principais [(tratamento: $F_1 = 54,13$; $p < 0,001$); (repetição: $F_3 = 13,64$; $p < 0,001$)],

mas não para a interação entre eles [$F_3 = 0,30$; $p = 0,82$]. Comparações post-hoc Fisher-LSD revelou que EtOH no padrão *binge drinking* reduz a distância percorrida na área central do campo aberto desde uma única sequência de episódios de *binge* na adolescência até um período prolongado de retirada da droga na fase adulta (1 BD: $p = 0,002$; 4 BD: $p = 0,003$; 8 BD: $p < 0,001$; Abst-14 dias: $p < 0,001$), indicando sugestivo comportamento ansiogênico (Figura 17 A).

ANOVA de duas vias demonstrou que não houve diferença sobre a distância percorrida na periferia do campo aberto para nenhum dos fatores principais [(tratamento: $F_1 = 0,49$; $p = 0,48$); (repetição: $F_3 = 0,92$; $p = 0,43$)], assim como, para a interação entre eles [$F_3 = 0,58$; $p = 0,62$]. Dessa forma, os animais EtOH-intoxicados não diferiram do grupo controle quanto à distância percorrida na periferia do campo aberto, este parâmetro de tigmotaxia foi utilizado como validação da distância percorrida pelos animais na área central (Figura 17 B).

ANOVA de duas vias revelou efeitos significantes para os principais fatores do percentual de entrada nos braços abertos no teste do LCE [(tratamento: $F_1 = 68,84$; $p < 0,001$); (repetição: $F_3 = 52,95$; $p < 0,001$)], mas sem interação entre eles ($F_3 = 1,10$; $p = 0,35$). Comparação subsequente com Fisher-LSD demonstrou diminuição no percentual de entrada nos braços abertos do LCE após todos os episódios de BD (1 BD: $p < 0,001$; 4 BD: $p = 0,003$; 8 BD: $p < 0,001$; Abst- 14 dias: $p < 0,001$), indicando comportamento ansiogênico decorrente da administração episódica e intermitente de EtOH da adolescência à idade adulta (Figura 17 C).

De outra maneira, ANOVA de duas vias demonstrou que não houve diferença sobre o número de entradas no braço fechado do LCE para os fatores tratamento ($F_1 = 0,003$; $p = 0,95$) e interação entre os principais fatores ($F_3 = 0,09$; $p = 0,96$), no entanto, apresentou diferença para o fator repetição ($F_3 = 13,10$; $p < 0,001$). Comparação post-hoc subsequente revelou que não houve alteração do número de entrada nos braços fechados do aparato entre os grupos experimentais controle e EtOH-intoxicado em todas as condições avaliadas (1 BD: $p = 0,81$; 4 BD: $p = 0,63$; 8 BD: $p = 0,93$; Abst-14d: $p = 0,96$), este parâmetro foi utilizado como validação de deambulação dos animais no LCE (Figura 17 D).

Além disso, foi percebido que os animais mais jovens reduziram tanto a distância percorrida na área central no campo aberto ($p < 0,001$ para grupos 8 BD e Abst-14d comparados ao 1 BD; $p = 0,02$ para grupos 8 BD e Abst-14d comparados ao 4 BD) quanto o percentual de entrada nos braços abertos do aparato do LCE ($p < 0,001$ para grupos 4 BD, 8 BD e Abst-14d comparados ao 1 BD; $p < 0,02$ para grupos 8 BD e Abst-14d comparados ao 4 BD) independente da interferência da administração de EtOH [Figura 17 A e C]. Do mesmo modo, os animais

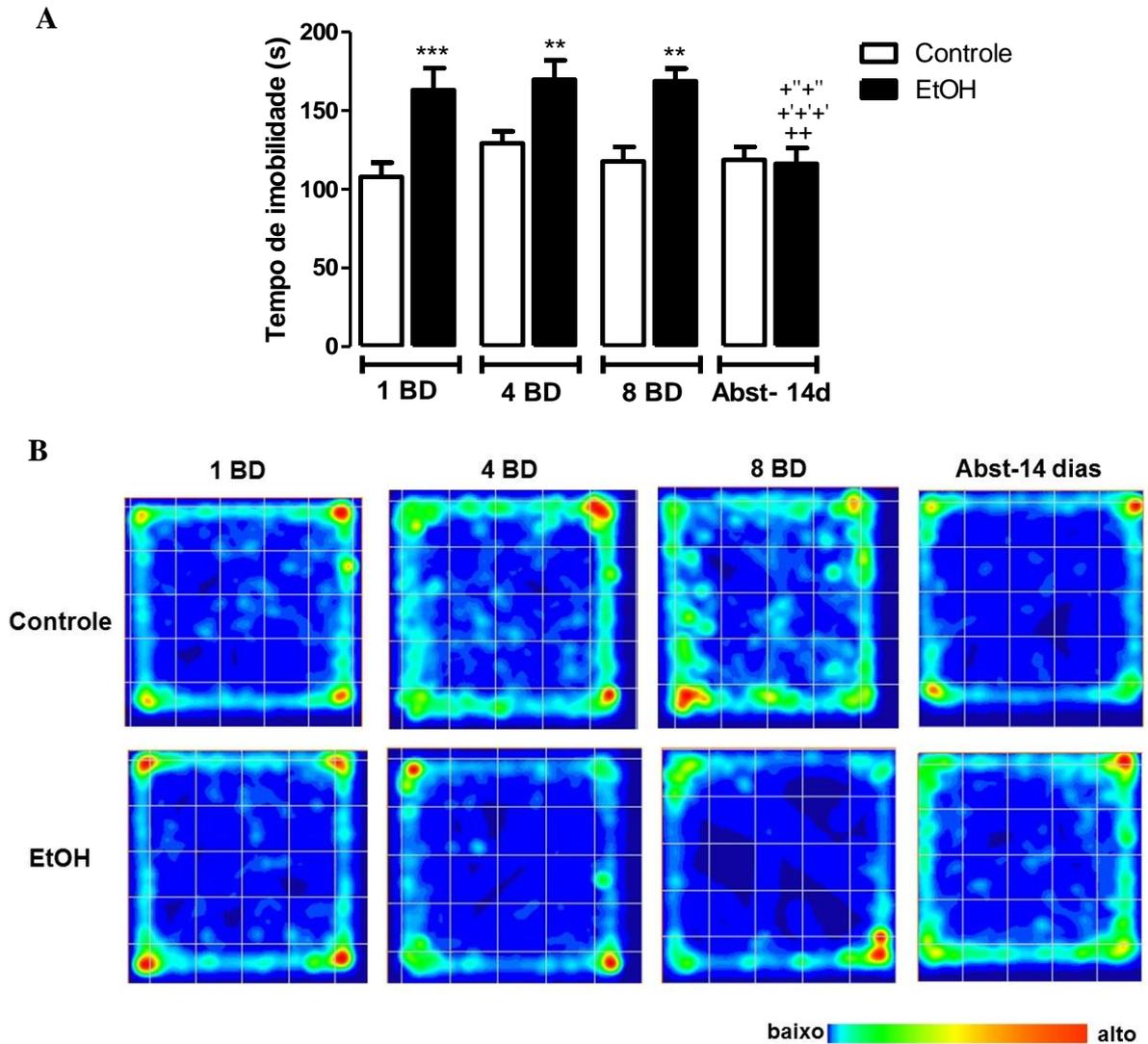


Figura 18: Efeitos da administração de etanol (EtOH) em forma de *binge drinking* sobre o padrão de exploração de ratos *Wistar* fêmeas na fase de adolescência à idade adulta no aparato do campo aberto avaliado pelo tempo de imobilidade (painel A) e ocupação por grupo dos animais (marcação no centro do animal no *software Anymaze*) durante o período de teste (painel B). Os resultados estão expressos como a média \pm e.p.m, durante 300 segundos, com 10 animais por grupo (ANOVA de duas vias, teste Fisher-LSD subsequente). ** $p < 0,01$ comparado ao respectivo grupo controle; *** $p < 0,001$ comparado ao respectivo grupo controle; ++ $p < 0,01$ comparado ao grupo EtOH- 1 BD; +++ $p < 0,001$ comparado ao grupo EtOH- 4 BD; +++ $p < 0,01$ comparado ao grupo EtOH- 8 BD.

ANOVA de duas vias revelou diferença entre os principais fatores, tratamento e repetição, sobre o tempo de imobilidade no *open field* [($F_1 = 23,67$; $p < 0,001$); ($F_3 = 3,35$; $p = 0,02$), respectivamente] e no fator de interação entre eles ($F_3 = 2,99$; $p = 0,03$). Post-hoc com teste de Fisher-LSD subsequente demonstrou aumento no tempo de imobilidade, em segundos, após a administração de EtOH na forma de *binge drinking* (Figura 18 A). No entanto, este efeito não permaneceu no período de 14 dias de abstinência devido os animais EtOH-intoxicados não

diferirem do grupo controle 14 dias após a retirada da droga ($p = 0,86$), ao contrário, reduziram o tempo de imobilidade em relação aos animais avaliados 7,5 após a última administração de EtOH- 1, 4 e 8 BD ($p = 0,003$; $p < 0,001$ e $p = 0,001$ respectivamente). Vale ressaltar que o aumento do tempo de imobilidade do animal no aparato é um parâmetro amplamente utilizado como indicativo de alto grau de estresse (WALSH e CULMMINS, 1979; KARL et al., 2003).

Imagens automáticas adquiridas por meio do programa Anymaze estão representadas pela ocupação, por grupo, dos animais nos períodos da adolescência à idade adulta no campo aberto (Figura 18 B). Estes dados demonstram o comportamento natural de roedores que é manter-se próximo dos limites de um ambiente novo, ou seja, mantiveram a preservação da tigmotaxia pois ficaram próximos às paredes do *open field*.

No entanto, é visivelmente perceptível que os animais controle tenham explorado mais o centro do aparato, em contrapartida, os grupos EtOH-intoxicados em todos os episódios de *binge drinking* preferiram permanecer nos cantos. Além disso, os pontos mais quentes de ocupação ocorrem nos cantos do aparato coincidindo com menor exploração do ambiente não familiar e aumento do tempo de imobilidade nos períodos de 1, 4 e 8 BD.

6.5 Binge drinking durante a adolescência à fase adulta provoca prejuízo temporário na memória de curta duração na tarefa de reconhecimento de objeto

A figura 19 demonstra o desempenho de ratas tratadas com $H_2O_{dest.}$ ou EtOH na forma de *binge drinking* da adolescência à idade adulta na tarefa de reconhecimento de objeto, a fim de avaliar a habilidade dos animais em reconhecer objetos em curto prazo (memória de curta duração). A avaliação realizada foi apresentada como média \pm e.p.m. da soma do tempo total de investigação dos objetos iguais (C1 e C2) durante a fase de treino e o índice de reconhecimento do novo objeto (T) na fase de teste.

O painel A (Figura 19) ilustra a comparação das médias no tempo total de investigação (tempo de investigação despendido no objeto C1 mais o tempo de investigação despendido no objeto C2). ANOVA de duas vias revelou efeito significativo para o fator repetidos episódios de *binge drinking* (repetição: $F_3 = 10,29$; $p < 0,001$), mas não para os fatores tratamento nem interação [(tratamento: $F_1 = 1,25$; $p = 0,26$); (interação: $F_3 = 0,11$; $p = 0,95$)]. Comparação post-hoc subsequente com Fisher-LSD demonstrou que não houve diferença significativa entre os grupos controle e EtOH ($p > 0,05$ em todos os períodos analisados) indicando semelhança no tempo de exploração nos objetos na sessão de treino pelos animais intoxicados e não-intoxicados.

Por conseguinte, comparação com teste de Fisher-LSD revelou diferença no tempo de investigação na fase de treino dos animais controle ou intoxicados mais jovens (37 DPN) em relação aos mais velhos - 58, 86 e 100 DPN (controle: $p = 0,02$ e $p < 0,001$; EtOH: $p = 0,07$ e $p < 0,001$ respectivamente). Os animais mais jovens com 37 DPN exibiram maior tempo despendido nos objetos idênticos que os demais animais avaliados em períodos mais avançados da vida.

No painel B (Figura 19), o índice de reconhecimento do novo objeto durante a fase de teste foi definido pela diferença no tempo de exploração entre o novo objeto e o objeto familiar divididos pelo tempo total gasto de exploração entre os mesmos objetos $(T - C3) / (T + C3)$. ANOVA de duas vias revelou efeitos significantes para os principais fatores (tratamento vs. repetidos episódios de *binge drinking*) e para o fator interação entre eles [(tratamento: $F_1 = 40,93$; $p < 0,001$); (repetição: $F_3 = 4,08$; $p = 0,009$) (interação: $F_3 = 5,62$; $p = 0,001$)]. Comparação post-hoc subsequente com Fisher-LSD demonstrou redução do índice de discriminação do objeto T após repetidos episódios de *binge drinking* da adolescência à fase adulta (1BD: $p = 0,007$ e $p < 0,001$ para 4 e 8 BD), revelando que os animais EtOH-intoxicados passaram menos tempo investigando o novo objeto após a administração de EtOH.

No entanto, o prejuízo provocado pelo EtOH no padrão *binge* da adolescência à fase adulta sobre a memória de curta duração na tarefa de reconhecimento de objeto foi temporária, haja vista que os animais que consumiram EtOH no padrão *binge* desde a adolescência à idade adulta obtiveram maior índice de reconhecimento na fase de teste 14 dias após a retirada da droga na fase adulta ($p < 0,001$ em relação a 1, 4 e 8 BD).

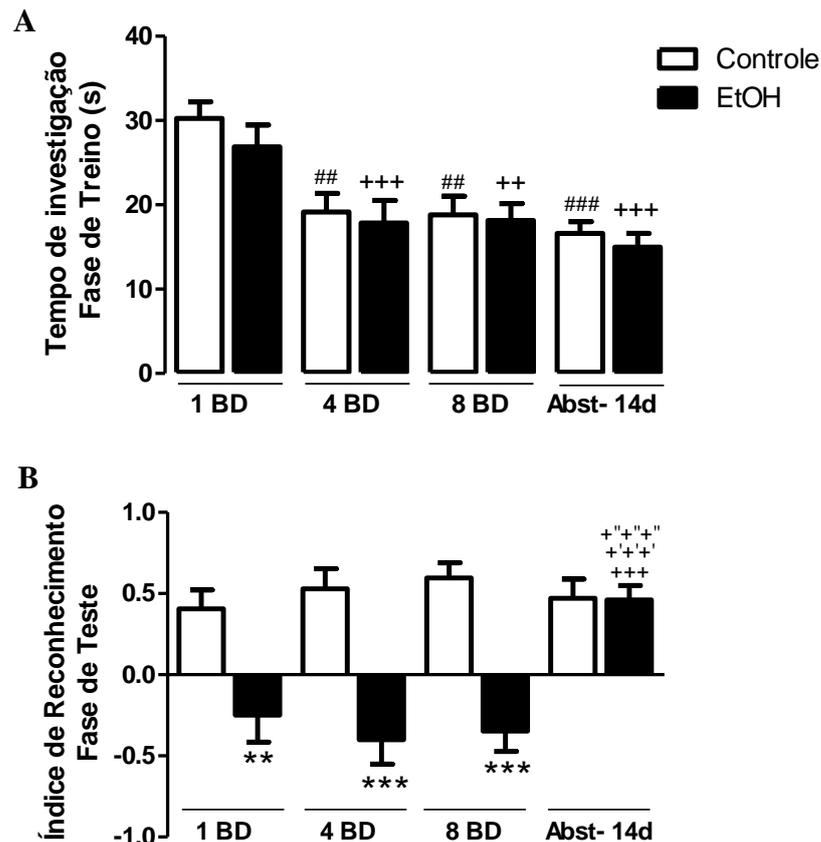


Figura 19: Efeitos da administração de etanol (EtOH) em forma de *binge drinking* sobre a memória de curta duração de ratas na fase de adolescência à idade adulta avaliadas no teste de reconhecimento do objeto. (A) As barras representam o tempo total de investigação do objeto C1 mais o objeto C2 (C1+C2) em segundos. (B) O índice de reconhecimento foi calculado pelo tempo que os animais desprenderam investigando os objetos novo e familiar $[(T - C3) / (T + C3)]$ durante o teste realizado 30 minutos após o treino. Os resultados estão expressos como a média \pm e.p.m do tempo de investigação na fase de treino e o índice de reconhecimento na fase de teste, durante 180 segundos, com 10 animais por grupo (ANOVA de duas vias, teste Fisher-LSD subsequente). ** $p < 0,01$ comparado ao respectivo grupo controle; *** $p < 0,001$ comparado ao respectivo grupo controle; ++ $p < 0,01$ comparado ao grupo EtOH- 1 BD; +++ $p < 0,001$ comparado ao grupo EtOH- 1 BD; ++++ $p < 0,001$ comparado ao grupo EtOH- 4 BD; ++++ $p < 0,001$ comparado ao grupo EtOH- 8 BD; ## $p < 0,01$ comparado ao grupo controle- 1 BD; ### $p < 0,001$ comparado ao grupo controle- 1 BD.

6.6 Efeitos bioquímicos após administração em *binge drinking* durante a adolescência à fase adulta de ratas

6.6.1 REPETIDOS EPISÓDIOS DE ETOH GERA AUMENTO DOS NÍVEIS DE CORT DESDE A ADOLESCÊNCIA À FASE ADULTA

A concentração dos níveis de CORT do soro de ratos *Wistar* fêmeas após administração episódica e intermitente de EtOH da adolescência à fase adulta estão ilustrados na figura 20. ANOVA de duas vias demonstrou diferença significativa no fator tratamento ($F_1 = 41,69$; $p <$

0,001), mas sem diferença no fator repetição de episódios de EtOH e na interação entre os principais fatores [(repetição: $F_3 = 1,48$; $p = 0,23$); (interação: $F_3 = 0,57$; $p = 0,63$)]. Subsequente análise com Fisher-LSD revelou que a concentração de CORT é elevada por tempo prolongado após a administração de EtOH no padrão *binge* desde a adolescência à idade adulta ($p < 0,05$ para todos períodos avaliados).

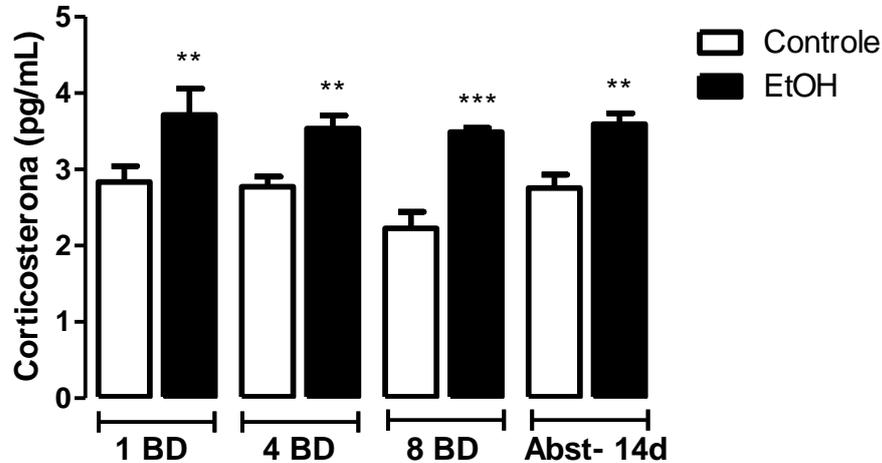


Figura 20: Efeitos da administração de etanol (EtOH) em forma de *binge drinking* sobre os níveis de corticosterona (CORT) do soro de ratas na fase de adolescência à idade adulta. Os resultados estão expressos como a média \pm e.p.m da concentração de CORT, com 4-5 animais por grupo (ANOVA de duas vias, teste Fisher-LSD subsequente). ** $p < 0,01$ comparado ao respectivo grupo controle; *** $p < 0,001$ comparado ao respectivo grupo controle.

6.6.2 ETOH INTERMITENTE E EPISÓDICO PROVOCA ALTERAÇÃO DA QUANTIDADE DE IMUNOCONTEÚDO DE BDNF NO HIPOCAMPO

A figura 21 demonstra o estudo da quantidade de imunocontéudo de neurotrofina no hipocampo de ratos *Wistar* fêmeas após administração intermitente e episódica de EtOH da adolescência à fase adulta por meio da técnica de *Western blot*. A ANOVA de duas vias demonstrou diferença significativa entre os principais fatores (tratamento vs. repetição) [(tratamento: $F_1 = 20,51$; $p < 0,001$); (repetição: $F_3 = 3,39$; $p = 0,03$)] mas sem diferença na interação entre eles ($F_3 = 0,48$; $p = 0,69$). Fisher-LSD subsequente revelou que o imunocontéudo de BDNF hipocampal é reduzido após a administração de EtOH no padrão *binge* desde a adolescência à idade adulta (1 BD: $p = 0,008$; 4 BD: $p = 0,037$; 8 BD: $p = 0,01$).

Além disso, post-hoc com Fisher-LSD demonstrou uma redução mais acentuada da neurotrofina hipocampal na fase adulta dos animais EtOH-intoxicados que iniciaram o *binge drinking* na fase de adolescência perdurando a administração pelo período de 8 semanas de

repetidos episódios de ETOH em comparação aos animais que consumiram a droga até a fase de adolescência tardia ($p = 0,02$). Apesar da depleção da quantidade de imunocónteuódo de BDNF hipocampal ser mais intensa no período denominado de 8 BD, quatorze dias após a retirada do EtOH foi suficiente para o retorno dos níveis normais dos valores da neurotrofina no hipocampo ($p = 0,04$).

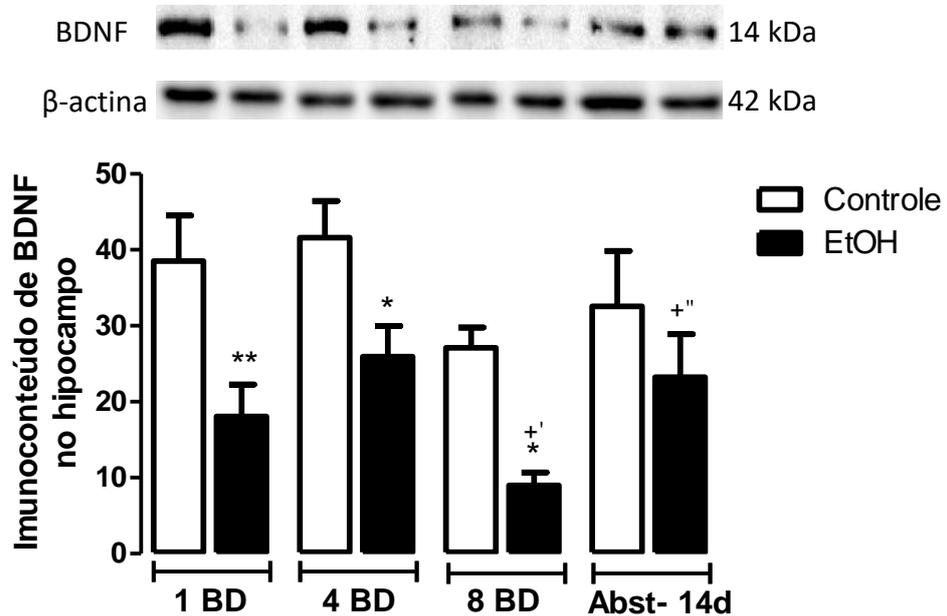


Figura 21: Efeitos da administração de etanol (EtOH) em forma de *binge drinking* sobre a quantidade de imunocónteuódo de BDNF no hipocampo de ratas na fase de adolescência à idade adulta por meio do método de *Western blot*. Os resultados estão expressos como a média \pm e.p.m do imunocónteuódo de BDNF no hipocampo, com 4-5 animais por grupo (ANOVA de duas vias, teste Fisher-LSD subsequente). * $p < 0,05$ comparado ao respectivo grupo controle; ** $p < 0,01$ comparado ao respectivo grupo controle; +' $p < 0,05$ comparado ao grupo EtOH- 4 BD; +'' $p < 0,05$ comparado ao grupo EtOH- 8 BD.

6.6.3 CORRELAÇÃO ENTRE IMUNOCÓNTEUÓDO DE BDNF NO HIPOCAMPO E ÍNDICE DE DISCRIMINAÇÃO NA TAREFA DE RECONHECIMENTO DE OBJETO

A redução da quantidade de imunocónteuódo de BDNF no hipocampo provocada pela administração de EtOH de forma episódica e intermitente da adolescência à idade adulta foram correlacionadas com do índice de reconhecimento na fase de teste da tarefa de reconhecimento de objeto (Figura 22). Análise de correlação de Pearson revelou que as duas variáveis possuem coeficientes de correlação positiva cuja tendência é de aumentar juntos ($r = 0,76$; $p = 0,0003$).

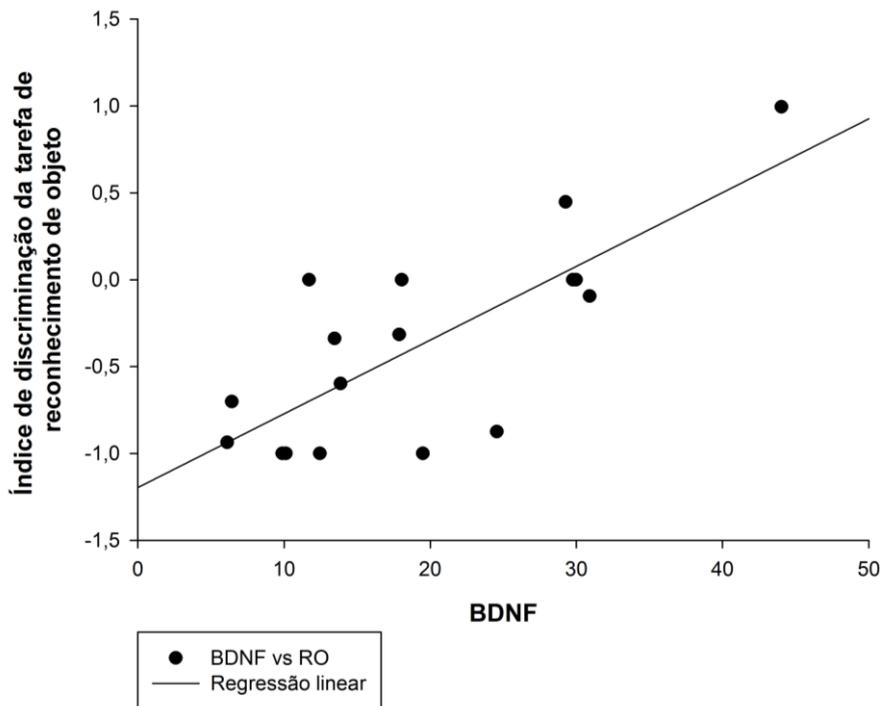


Figura 22: Correlação da quantidade de imunoconteúdo de BDNF no hipocampo e valores do índice de discriminação da tarefa de reconhecimento de objeto de ratas após o consumo de etanol (EtOH) em forma de *binge drinking* na fase de adolescência à idade adulta. Análise de correlação de Pearson demonstra relação positiva entre as duas variáveis. Os resultados estão expressos com a distribuição de correlação e regressão linear, com 4-5 animais para valores de BDNF e 10 animais para valores do índice de reconhecimento de objeto por período.

6.6.4 ADMINISTRAÇÃO DE *BINGE DRINKING* PRODUZ DESEQUILÍBRIO NO BALANÇO OXIDATIVO DE RATAS DA ADOLESCÊNCIA À IDADE ADULTA

A figura 23 ilustra as mensurações realizadas sobre o balanço oxidativo de ratas *Wistar* após a administração de EtOH no padrão intermitente e episódico da adolescência à idade adulta.

O painel A demonstra os níveis de peroxidação lipídica por meio da concentração de MDA. A ANOVA de duas vias revelou que não há diferença no fator tratamento ($F_1 = 0,96$; $p = 0,33$), no entanto existe diferença no fator repetição de episódios de *binge drinking* e no fator interação entre os principais fatores [(repetição: $F_3 = 4,11$; $p = 0,01$); (interação: $F_3 = 4,11$; $p = 0,01$)] na qual os níveis da diferença do fator repetição depende do fator tratamento.

Teste de Fisher-LSD subsequente demonstrou que após a administração de EtOH em *binge* agudo na fase de adolescência os níveis de MDA reduziram ($p = 0,01$) diferindo dos demais resultados a respeito do *binge drinking* neste protocolo (4 BD: $p = 0,04$; 8 BD: $p <$

0,001; Abst-14d: $p = 0,01$). Em contrapartida, com a cronicidade da administração, ocorre aumento da produção de MDA deflagrada no período de 8 semanas de repetidos episódios de EtOH da adolescência à idade adulta ($p = 0,003$), inclusive com valores maiores da concentração de MDA em relação ao período anterior estudado (4 BD, $p = 0,01$). Por outro lado, a elevação dos níveis de peroxidação lipídica não permanecem elevados 14 dias após a retirada da droga ($p = 0,63$), até mesmo reduzindo a concentração de MDA encontrada 7,5 h após a última administração de EtOH no padrão *binge* da adolescência à idade adulta ($p = 0,01$).

A atividade da enzima catalase foi avaliada durante o protocolo de intoxicação no padrão *binge* utilizado (Painel B). ANOVA de duas vias demonstrou que não existe diferença significativa no fator tratamento ($F_1 = 0,0008$; $p = 0,97$), no entanto existe diferença no fator repetição de episódios de *binge drinking* e no fator interação entre os principais fatores [(repetição: $F_3 = 4,96$; $p = 0,006$); (interação: $F_3 = 4,96$; $p = 0,006$)].

Post-hoc com teste de Fisher-LSD revelou que a atividade da catalase é elevada após a administração de EtOH (3 g/kg/dia) no padrão *binge* por 3 dias consecutivos na fase de adolescência ($p = 0,005$) diferindo de qualquer outro período analisado neste paradigma de intoxicação ($p < 0,001$ para todos os períodos analisados). No entanto, há redução da atividade desta enzima após a continuidade do protocolo de intoxicação na fase adulta dos animais ($p = 0,04$).

A atividade da enzima SOD foi mensurada no sangue de ratas EtOH- intoxicadas no padrão *binge* (Painel C). A ANOVA revelou que não há diferença no fator tratamento ($F_1 = 0,58$; $p = 0,29$), no entanto existe diferença no fator repetição de episódios de *binge drinking* e no fator interação entre os principais fatores [(repetição: $F_3 = 7,23$; $p < 0,001$); (interação: $F_3 = 7,23$; $p < 0,001$)].

Análise subsequente com teste de Fisher-LSD demonstrou que após a administração de EtOH em *binge* agudo na fase de adolescência aumenta a atividade da SOD ($p = 0,002$) diferente dos demais períodos analisados neste paradigma de intoxicação ($p < 0,001$ para 4 e 8 BD e $p = 0,01$ em relação ao grupo Abst- 14d). Após 4 repetidos episódios de *binge drinking* durante a adolescência, a atividade enzimática da SOD é reduzida ($p = 0,002$). Após um período prolongado de 14 dias sem administração de EtOH subsequente a um período de administração episódica e intermitente da adolescência à idade adulta, a atividade da SOD tende a normalizar diferindo significativamente da atividade enzimática encontrada logo após os períodos de administração de EtOH de 4 BD e 8 BD ($p = 0,009$ e $p = 0,04$ respectivamente).

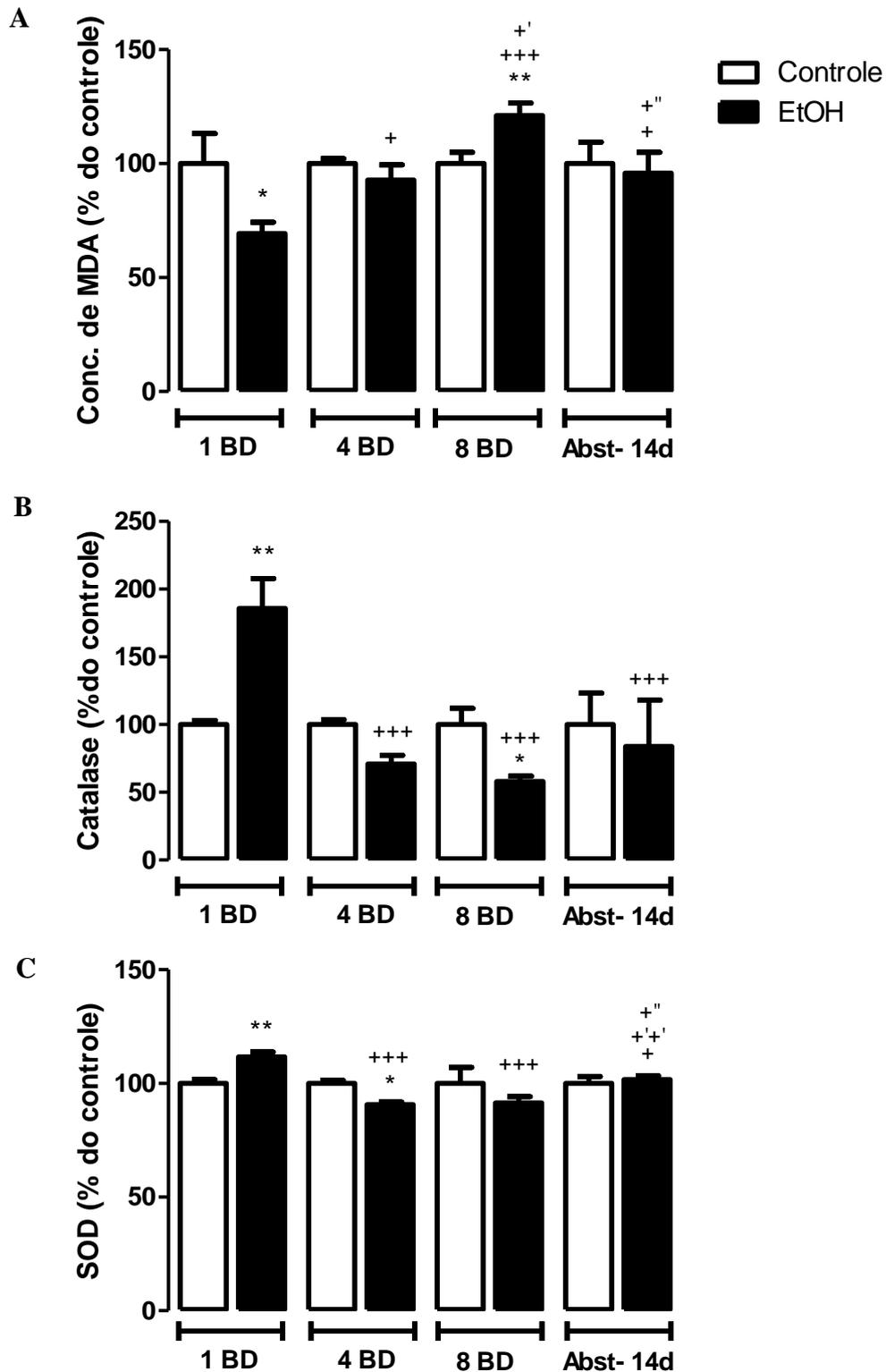


Figura 23: Efeitos da administração de etanol (EtOH) em forma de *binge drinking* sobre o balanço oxidativo de ratas na fase de adolescência à idade adulta por meio do percentual do controle da concentração de malondialdeído (MDA, painel A) e dos percentuais do controle das atividades enzimáticas de catalase (painel B) e superóxido-dismutase (SOD, painel C). Os resultados estão expressos como a média \pm e.p.m, com 4-5 animais por grupo (ANOVA de duas vias, teste Fisher-LSD subsequente). * $p < 0,05$ comparado ao respectivo grupo controle; ** $p < 0,01$ comparado ao respectivo grupo controle; + $p < 0,05$ comparado ao grupo EtOH- 1 BD; +++ $p < 0,001$ comparado ao grupo EtOH- 1 BD; +' $p < 0,05$ comparado ao grupo EtOH- 4 BD; +++ $p < 0,01$ comparado ao grupo EtOH- 4 BD; ++ $p < 0,05$ comparado ao grupo EtOH- 8 BD.

VII DISCUSSÃO

7. DISCUSSÃO

O presente estudo demonstra pela primeira vez que a administração intermitente e episódica (3 g/kg/dia) de EtOH da adolescência à fase adulta produz prejuízos sobre o comportamento motor e processo mnemônico, além de alterações comportamentais semelhantes à ansiedade. Estas relações estavam acompanhadas de alterações bioquímicas, tais como elevação dos níveis do hormônio CORT sanguíneo, redução da quantidade de imunocontéudo de BDNF no hipocampo e alteração do balanço oxidativo sanguíneo. Este estudo é pioneiro também em avaliar os efeitos do álcool em períodos de recortes importantes do desenvolvimento de ratos fêmeas da adolescência à fase adulta a fim de caracterizar quais são os prejuízos imediatos e em longo prazo derivados do *binge drinking*.

A adolescência é um termo usado para descrever um estágio de transição entre a infância e a idade adulta e consiste em diversas mudanças comportamentais, neuroquímicas e morfológicas (ARAIN et al., 2013). Além disso, é uma etapa do desenvolvimento com elevada ocorrência de comportamento de risco, impulsividade e busca por novidade que caracterizam a vulnerabilidade desta população ao consumo de drogas psicotrópicas e, ao mesmo tempo, momento de maior sensibilidade aos efeitos nocivos das mesmas tanto em relação à propensão do desenvolvimento de dependência quanto aos mecanismos neurotóxicos (CREWS et al., 2007; GUERRI e PASCUAL, 2010; ARAIN et al., 2013; SELEMON et al., 2013)

Para Semple e colaboradores (2013) a estreita janela entre o período de 35-49 DPN da idade de roedores é o período mais usual descrito como adolescência ou “periadolescência” e equivale em humanos em torno dos 12-18 anos de idade. Dessa forma, o período inicial da administração de EtOH utilizado neste estudo ocorreu no período da adolescência de ratas *Wistar* as quais encontravam-se em período de maturação do SNC em desenvolvimento.

Para o estudo sobre os danos provocados pelo consumo de EtOH, deve-se salientar que os prejuízos encontrados variam de acordo com o modo de consumo os quais são determinados pela quantidade, período e frequência de ingestão (TAPERT et al., 2004; ZEIGLER et al., 2005; YANG et al., 2014). Conceitualmente existem formas de beber denominada pesada, moderada e leve que pode ser contínua ou intermitente bem como podem ocorrer de forma aguda ou crônica (NIAAA, 2004; WHO, 2014).

O consumo de grandes quantidades de EtOH em curto período de tempo, seguido por um período de abstinência - ou em *binge drinking*- representa a forma dominante de uso indevido de álcool entre os adolescentes e adultos jovens (NIAAA, 2004; CREGO et al., 2009; CREGO et al., 2010; PETIT et al., 2013; JACOBUS e TAPERT, 2013). Esta modalidade tem

crescido no gênero feminino e é considerado como um precursor do alcoolismo crônico (NIAAA, 2004; SKALA e WALTER, 2013; WHO, 2014).

Neste estudo foi utilizado o modelo de intoxicação alcoólica o qual consiste de uma forma de administração intermitente e episódica – conhecido como *binge drinking*- da adolescência à idade adulta a fim de avaliar as alterações decorrentes da administração de EtOH no período crítico do desenvolvimento. Além disso, o modelo experimental foi utilizado com fêmeas a fim de elucidar os efeitos desta forma de consumo sobre a população feminina que tem aumentado o uso abusivo de EtOH (INPAD, 2013).

Nosso grupo de pesquisa tem realizado estudos a respeito dos prejuízos sistêmicos do EtOH crônico no modelo de *heavy drinking* (altas doses de EtOH, 6,5 g/kg/dia) da adolescência à idade adulta de ratos *Wistar* fêmeas sobre importantes processos fisiológicos em diferentes tecidos corporais, tais como alteração da homeostase da cavidade oral deflagrada pela perda óssea alveolar e alterações em glândulas salivares (BANNACH et al., 2015; FERNANDES et al., 2015) e no sistema nervoso verificado por prejuízos neurocomportamentais bem como danos em populações celulares do tecido encefálico (OLIVEIRA et al., 2014; TEIXEIRA et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2015; FONTES-JÚNIOR et al., 2016).

Após a etapa inicial de descobertas sobre os efeitos derivados do *heavy drinking* sobre diversos tecidos corporais relacionados principalmente à cavidade oral e SNC, surgiram novas perguntas acerca dos efeitos decorrentes da administração intermitente e episódica de EtOH, haja vista que este é o modelo de consumo dominante de uso indevido do álcool em adolescentes e adultos jovens (CREGO et al., 2009; CREGO et al., 2010; INPAD, 2013). Além disso, a frequência de consumo nessa população ocorre 3 vezes na semana particularmente às quintas-feiras e fins de semana (PARADA et al., 2011; BEETS et al., 2009).

Assim, foi proposto então neste projeto a primeira investigação dos efeitos após a administração da droga por três dias consecutivos para simular o *binge drinking* humano em diferentes períodos de intoxicação (1, 4 e 8 semanas) a fim de avaliar a partir de que período da administração intermitente e episódica ocorrem os prejuízos neurocomportamentais relacionados às mesmas áreas funcionais do sistema nervoso encontrados em nossos estudos anteriores e alterações bioquímicas relacionadas à intoxicação.

Além disso, propomos investigar se as possíveis alterações ocorridas após 8 semanas de repetidos episódios de *binge drinking* persistem após um período de 14 dias sem qualquer administração. Considerando que 11,8 dias na idade adulta em ratos equivale a um ano na idade de humanos adultos (QUINN, 2005), quatorze dias após 8 repetidos episódios de *binge drinking* equivale em média à 1 ano e 2 meses de abstinência em humanos. Assim, este período

adicionado em nosso estudo teve o intuito de avaliar a habilidade dos animais em reverter os possíveis efeitos do tratamento com EtOH na forma de *binge* sobre o SNC ou se as prováveis alterações perduram por tempo prolongado.

Diante do exposto, após a administração do protocolo experimental, os animais seguiram para realização de uma bateria de testes comportamentais que consistiu de avaliação sobre a deambulação dos animais e a função motora mais detalhada, por meio de análises da coordenação motora, equilíbrio e ocorrência de bradicinesia nos movimentos realizados sobre uma viga vertical.

Além disso, foi realizada a qualificação da deambulação destes animais a respeito da natureza do comportamento tipo emocional no teste do campo aberto e, em seguida, avaliados no teste do LCE o qual é sensível para análise de comportamento semelhante à ansiedade (KARL et al., 2003). Ademais, o efeito do *binge drinking* da adolescência à fase adulta sobre a memória de reconhecimento de objeto também foi descrito neste estudo. Adicionalmente, foi realizado a investigação sobre os efeitos bioquímicos por meio dos níveis de CORT, balanço oxidativo e imunoconteúdo de BDNF no hipocampo dos animais.

Existem algumas divergências nas definições das diferentes classificações dos níveis de *binge drinking*. Inclusive, a definição do termo estabelecido pelo NIAAA (2004) sobre beber nesta modalidade de consumo é considerada a concentração acima de 80 mg/dL de EtOH no sangue em um único episódio dentro de um período de duas horas (5 ou mais doses para os homens ou 4 ou mais doses para as mulheres), desta forma, não há delimitação fundamentada para os tipos de bebedeira.

No entanto, tem-se frequentemente utilizado doses de EtOH que alcançam níveis sanguíneos em torno de 250-400 mg% em estudos sobre *binge* que conhecidamente geram dependência alcoólica, mimetizando altos níveis de alcoolemia e o consumo pesado de EtOH comum entre os etilistas (CREWS et al., 2000; CREWS e NIXON, 2009; MCCLAIN et al., 2013). Ademais, concentrações alcoólicas sanguíneas em ratos jovens entre 43-106 mg/dL foram descritas estando associadas ao consumo de EtOH em *binge* denominado de moderado (SAMPSON et al., 1999).

Nós adotamos a dose de 3 g/kg/dia (solução de 20% v/v) nos episódios de *binge drinking* conforme protocolos utilizados em outras investigações que avaliam prejuízos sistêmicos decorrentes da intoxicação de EtOH neste paradigma intermitente e episódico (LAUING et al. 2008; LINDTNER et al. 2013; NOGALES et al., 2014). Esta dose utilizada em nosso estudo obteve concentração de 197,4 mg/dL de EtOH no sangue, este valor é considerado para alguns

autores como níveis de alta a moderada concentração alcoólica devido estar na faixa de concentração entre 150 a 225 mg/dL (EHLERS et al., 2011; 2013).

Além disso, a concentração alcoólica após administração de EtOH por três dias consecutivos encontrado nos animais deste estudo foi semelhante aos valores encontrados em outra investigação que utilizou a mesma dose em uma única administração em ratos adolescentes (WALKER e EHLERS, 2009). Aliás, estes níveis de alcoolemia em nossos achados são consistentes com concentrações encontradas em pesquisa sobre o *binge drinking* em adolescentes humanos (DONOVAN, 2009). Dessa forma, a dose utilizada de 3 g/kg por episódio gerou o nível sanguíneo de EtOH pretendido no projeto para o estudo do modelo *binge drinking* em ratas adolescentes.

Livy e colaboradores (2003) realizaram um estudo contrastando a farmacocinética do EtOH (3,8 g/kg) em ratos e camundongos adolescentes em duas vias de administração (injeção intraperitoneal e gavagem intragástrica) avaliando a concentração sanguínea da droga nos animais. A avaliação intragástrica em ratos teve picos na concentração 60 minutos após a administração e declínio gradual chegando à zero após 450 minutos. Baseado nesse trabalho e com o intuito de avaliar os efeitos após a administração de EtOH, consideramos submeter os animais aos ensaios comportamentais 7,5 horas após a última administração de álcool.

Segundo Schulteis e Liu (2006) valores abaixo de 10 mg/dL na dosagem alcóolica de animais EtOH-intoxicados são considerados valores não detectáveis de alcoolemia. Em nosso estudo, sete horas e meia foi suficiente para encontrarmos valores não detectáveis de alcoolemia (0,74 mg/dL). Dessa forma, os animais EtOH-intoxicado no protocolo utilizado neste estudo atingiram a concentração que caracteriza o *binge drinking*. Além disso, estes mesmos animais foram submetidos aos ensaios comportamentais após o efeito da droga, validando o estudo dos efeitos da abstinência de EtOH no padrão *binge* por três dias consecutivos.

Inicialmente, não houve alterações no ganho de peso ou morte dos animais durante a administração de repetidos episódios de EtOH. Estes resultados retratam uma importante implicação desta forma de consumo na população adolescente em geral, haja vista que a aparente normalidade no desenvolvimento e a baixa taxa de mortalidade podem esconder prejuízos ou outras morbidades, tais como disfunções cognitivas e motoras, além de alterações bioquímicas importantes.

De forma geral, o álcool produz alterações funcionais e morfológicas no SNC, no entanto, tais efeitos não são uniformes (Crews et al., 2004). Tem sido documentado que regiões como córtex pré-frontal, hipocampo, cerebelo, substância branca e células da glia são as estruturas mais susceptíveis (HARPER et al., 1987; HARDING et al., 1996; BAKER et al.,

1999; ARAIN et al., 2013). De fato, a administração de EtOH em forma de *binge* produz maiores danos ao desenvolvimento cerebral comparado com achados de exposição contínua (BONTHIUS e WEST, 1990). Além disso, a retirada abrupta no consumo excessivo altera a integridade neuronal de regiões cerebrais vulneráveis como cerebelo, hipocampo e córtex gerando alterações no processo mnemônico, comportamento semelhante à ansiedade e comportamento motor (JUNG e METZGER, 2010).

O sistema nervoso é responsável por originar as diferentes formas de comportamento, assim, a análise comportamental pode ser considerada a maneira mais elementar para avaliação das funções neurais (WHISHAW et al., 1999). Karl e colaboradores (2003) realizaram uma abordagem sobre a seleção de procedimentos específicos adequados ao “*screening*” comportamental confiável em farmacologia e toxicologia. Segundo os autores, esse modelo de ensaio que detecta efeitos comportamentais específicos induzidos por drogas é vital para excluir resultados falsos positivos ou negativos. Neste estudo, foram avaliados testes confiáveis de domínios comportamentais específicos (funções motoras, relacionado à ansiedade e memória) em formato de “*screening*”.

Apesar dos prejuízos na função motora também depender do período e tempo de consumo do EtOH, é conhecido que os adolescentes são menos vulneráveis aos danos motores comparados aos adultos devido os mais jovens serem mais resistentes aos efeitos motores sedativos da droga (LITTLE et al., 1996; WHITE et al., 2002; VAN SKIKE et al., 2010; ACEVEDO et al., 2013). Esta característica da adolescência pode levar ao aumento do consumo de grande quantidade de álcool sem gerar a percepção dos efeitos toxicológicos.

Além disso, há evidências que fêmeas sejam menos susceptíveis aos efeitos deletérios do álcool em tarefas de aprendizagem motora, especialmente durante a adolescência em um paradigma de *binge drinking* (FORBES et al., 2013). Mesmo assim, nossos resultados demonstram que EtOH no padrão *binge* gerou prejuízo sobre o comportamento motor de fêmeas adolescentes reduzindo a atividade locomotora espontânea, ocorrência de bradicinesia, dano na coordenação motora e equilíbrio.

A tendência exploratória do animal em um novo ambiente no teste do campo aberto pode ser traduzida como atividade locomotora espontânea, utilizando-se os parâmetros de distância total percorrida na arena como medida de exploração horizontal e frequência de *rearings* decorrente da exploração vertical (KARL et al., 2003; BRENES et al., 2009). Este estudo demonstrou que a atividade exploratória horizontal e vertical foram prejudicadas após administração de EtOH no padrão *binge*. Estes prejuízos apareceram desde apenas uma

sequência de repetidos episódios na adolescência estendendo-se por período prolongado na idade adulta.

A administração de EtOH (3,25 g/kg) agudo no início da adolescência é conhecido por ter efeito estimulante na locomoção espontânea quando a avaliação da deambulação ocorre imediatamente após administração da droga, cerca de 20 minutos (ACEVEDO et al., 2014). Além disso, Acevedo e colaboradores (2013) têm demonstrado que ratos adolescentes são mais sensíveis à ação estimulante aguda do EtOH devido ao aumento encontrado da atividade locomotora destes animais no campo aberto em relação aos mais velhos (70 DPN). No entanto, também é notório que os efeitos pós-consumo do álcool reduzem a atividade locomotora exploratória em protocolos de estudo a respeito das primeiras horas de abstinência desta droga (PASCUAL et al., 2011; KUZMIN et al., 2012)

Recente estudo de nosso grupo de pesquisa revelou que a administração crônica de altas doses diárias de EtOH (6,5 g/kg/dia), durante toda a adolescência (35 a 90 DPN), reduziram a frequência de *rearings* na fase adulta avaliada 7 dias após a última administração da droga (FONTES-JÚNIOR et al., 2016). No entanto, não tem sido observado redução da atividade locomotora espontânea após 24 h e 7 dias após a última administração da droga no paradigma *heavy drinking* da adolescência à fase adulta (OLIVEIRA et al., 2014; FONTES-JÚNIOR et al., 2016). Estes resultados sugerem que a frequência de *rearings* seja um parâmetro mais sensível ao efeito deletério do álcool, no teste do campo aberto

Pascual e colaboradores (2011) avaliaram o efeito do consumo voluntário crônico de EtOH (média de 10 g/kg) iniciado no final da periadolescência (42-49 DPN) de roedores durante 5 meses de intoxicação. Estes autores encontraram redução da atividade locomotora espontânea dos animais em 8 horas após a retirada da solução de EtOH, no entanto este prejuízo não perdurou por tempo prolongado (15 dias). Em contrapartida, nosso estudo demonstra que a administração intermitente e episódica de EtOH (3 g/kg) da adolescência à idade adulta reduz a atividade locomotora exploratória dos animais a curto e longo prazo. Estes achados indicam o maior efeito nocivo decorrente do consumo do álcool no modelo *binge drinking* usual entre os adolescentes.

A fim de abranger o estudo sobre os vários aspectos da função motora, foram utilizados os ensaios comportamentais do *pole test*, BWT e rotarod. O primeiro foi desenvolvido para mensurar a bradicinesia e redução do tônus muscular avaliando a capacidade do animal inverter seu eixo e descer até a plataforma (MATSUURA et al., 1997; KARL et al., 2003). De outro modo, os dois últimos avaliam coordenação e equilíbrio motor (KARL et al., 2003; STANLEY et al., 2005). Quando objetiva-se avaliar esses dois parâmetros, deve ser escolhido mais de um

teste comportamental sensório-motor para que, dessa forma, possa capturar detalhes relacionados ao foco do estudo (CRABBE et al., 1999). Assim, a função motora dos animais foi avaliada de forma ampla, capaz de detectar alterações motoras mais finas além da atividade locomotora geral.

O desenvolvimento da bradicinesia é mensurado pelo prolongamento do tempo de virada e de descida do animal à base da plataforma (MATSUWAKI et al., 2008), esse efeito é amplamente encontrado em doenças neurodegenerativas do SNC como a doença de Parkinson devido a degeneração de neurônios da via dopaminérgica nigroestriatal (GRAFTON, 2004; PHILLIPS et al., 2009; ANTZOULATOS et al., 2010). Este sintoma está associado com o funcionamento anormal da circuitaria intrínseca dos núcleos da base através da hipoatividade seletiva da área motora suplementar e córtex pré-frontal dorsal, que são áreas de associação frontais que recebem entrada subcortical principalmente a partir dos gânglios da base (BROOKS, 1999; GRAFTON, 2004).

Além disso, tem sido descrito que a bradicinesia em roedores é aumentada principalmente após lesão e morte celular nos terminais dopaminérgicos do estriado (OGAWA et al., 1985; DIGUET et al., 2005). De acordo com o que foi observado, os grupos EtOH-intoxicado apresentaram tempo de descida elevado em relação aos respectivos grupos controle, indicando que a intoxicação pelo EtOH em forma de *binge drinking* gera prejuízo na cinética da atividade motora dos animais perdurando por tempo prolongado. Assim, nossos achados indicam prejuízo na conexão subcortical e/ou subcortical com áreas motoras corticais em adolescentes a partir de três repetidos episódios de *binge drinking* que perdura até a fase adulta sem recuperação funcional após 14 dias de retirada da droga. Este dano duradouro provavelmente é decorrente da perturbação da conexão dopaminérgica em maturação no SNC adolescente (ARAIN et al., 2013).

Para avaliar a coordenação motora e o equilíbrio dos animais experimentais foi empregado o teste do BWT e do rotarod que são amplamente utilizados conjuntamente para avaliar a coordenação e refinamento motor (CARTER et al., 1999). Segundo Crabbe e colaboradores (2003) um único conjunto de parâmetros em um ensaio motor é insuficiente para caracterizar influências genéticas sobre o comportamento, além disso, os autores sugerem ser razoável assumir que cada ensaio selecionado reflita a mesma demanda de sistemas neurobiológicos como locomoção, equilíbrio, propriocepção e marcha padronizada. Desta forma, foram selecionados dois ensaios que permitam verificar os mesmos parâmetros por meio

da locomoção espontânea e forçada sobre um cilindro giratório (BWT e rotarod respectivamente).

Conforme o objetivo do BWT de avaliar características atáxicas e distônicas através da dificuldade do animal em transpassar as vigas de diferentes formas e de áreas de secção transversal (KARL et al., 2003), nosso estudo demonstrou que a administração de EtOH no modelo *binge drinking* provoca prejuízo motor principalmente nas vigas de fina espessura evidenciado pelo aumento no tempo de escape associado (dados não ilustrados) com o acentuado número de escorregadas em uma tarefa que necessita, além de equilíbrio, coordenação motora para percorrer as vigas de secções transversais mais estreitas. Ademais, os danos sobre a coordenação motora e equilíbrio ocorreram logo após as primeiras horas de retirada da droga na fase da adolescência e perdurou por tempo prolongado na idade adulta.

Por outro lado, o teste do rotarod mede distúrbios de marcha e incoordenação motora a partir da capacidade que o animal tem de manter-se sobre uma haste giratória, para isso, verifica-se o tempo de latência de queda do animal (KARL et al., 2003). No presente estudo, a administração de EtOH no padrão *binge* gera déficit motor a curto e longo prazo em fêmeas da adolescência à fase adulta caracterizado pela redução no tempo de permanência sobre o aparelho quando comparado aos respectivos grupos controle.

Neste sentido, para que o movimento ocorra corretamente, as áreas motoras relacionadas à organização e ao controle do movimento – córtex motor primário, área motora suplementar, área pré-motora e motora cingular - influenciam vias descendentes e interneurônios medulares por meio de suas conexões com o tronco encefálico, núcleos da base e cerebelo (KURATA, 1994; NAIR et al., 2003). Dessa forma, as ataxias resultam de distúrbios do cerebelo e/ou de suas conexões, mas os circuitos que integram o córtex motor e corpo estriado também estão envolvidos (CHUCK et al., 2006).

A incoordenação motora é frequentemente usada como índice de intoxicação produzida por drogas que deprimem o SNC (CRABBE et al., 2003). Tem sido observado que o EtOH, no período de abstinência, pode regular negativamente (“*down-regulation*”) neurônios gabaérgicos associado à exacerbação da via glutamatérgica na maioria das áreas cerebrais promovendo efeitos comportamentais típicos deste período como alteração do controle motor, aprendizado e memória (VENGELINE et al., 2008; JUNG e METZGER, 2010; MÖYKKYNEN e KORPI, 2012). Assim, os resultados obtidos neste estudo revelam que repetidos episódios de *binge drinking* aumenta o número de escorregadas sobre as vigas mais finas no BWT, assim como, redução no tempo de permanência no rotarod provavelmente devido a estes eventos moleculares descritos no período de abstinência.

Van Skike e colaboradores (2010) relataram que as células de Purkinje são mais insensíveis à exposição aguda do EtOH no início da adolescência, mas tornam-se sensíveis após repetidas exposições. Estes achados contribuem com nosso estudo, haja vista que os prejuízos motores encontrados neste protocolo ocorreram após repetidos episódios de *binge drinking*. Além disso, os prejuízos motores identificados por tempo prolongado podem estar relacionados à maturação da neurotransmissão GABAérgica durante a adolescência em que foi iniciado o consumo de EtOH (ARAIN et al., 2013).

Adicionado a isso, Pascual e colaboradores (2007) estudaram os efeitos do *binge drinking* cujos níveis de alcoolemia eram em torno de 210 mg/dL de EtOH, 2 dias *on* e 2 *off* durante duas semanas em ratos adolescente (25 DPN). Estes autores encontraram prejuízo na coordenação e equilíbrio nos animais ao atravessarem vigas graduadas no BWT 24 horas pós-consumo, assim como, quando testados na idade adulta (60 DPN) 21 dias pós-consumo. Além disso, os prejuízos encontrados estavam associados com elevados níveis de fatores associados à inflamação como COX-2, iNOS e neurodegeneração em regiões cerebrais como cerebelo e neocórtex.

O cerebelo, juntamente com o estriado, é um componente de circuitos cortical-subcorticais envolvidos em aspectos distintos do aprendizado e controle motor (MIDDLETON e STRICK, 2002). Segundo Crabbe e colaboradores (2003) vigas mais largas no teste do BWT refletem o aprendizado motor, além de coordenação e equilíbrio. Além disso, o teste do rotarod pelo repetido número de exposições ao aparelho, mesmo que em velocidade constante, também reflete aprendizado motor (LALONDE e STRAZIELLE, 2011). Diante disso, este estudo propõe que os ratos fêmeas após a administração de EtOH intermitente e episódica, em alta dose, apresentaram coordenação, equilíbrio e aprendizado motor prejudicados.

Por se tratar de um estudo temporal dos efeitos da administração intermitente e episódica de EtOH da adolescência à fase adulta, nossos achados demonstram que existe déficit motor independentemente do número de episódios de *binge drinking*. No entanto, vale ressaltar o maior prejuízo motor no período de 4 semanas de repetidos episódios de *binge drinking* durante a fase da adolescência devido os animais, após atravessar vigas de menor espessura no BWT, ser o único grupo com altos números de escorregadas ao atravessar as vigas circulares de maiores espessuras. Similarmente no resultado do rotarod, este período de intoxicação foi o único com redução da latência de queda em todas as exposições ao aparato. Dessa forma, a aprendizagem motora com maior prejuízo foi neste período estudado.

Curiosamente, nossos achados demonstram uma pequena adaptação e atenuação do dano no aprendizado motor dos animais EtOH-intoxicado, haja vista que há uma recuperação gradual ou simplesmente adaptação do organismo identificada pelo maior tempo de permanência dos animais intoxicados após 8 repetidos episódios de *binge drinking* sobre o cilindro giratório em relação ao grupo 4 BD na terceira exposição ao aparato no teste do rotarod. Além disso, houve uma recuperação parcial do aprendizado motor após um período prolongado de retirada da droga mesmo com a presença de prejuízo da coordenação motora e equilíbrio.

Vale ressaltar que a administração de EtOH no padrão *binge*, em nosso protocolo, gerou prejuízos no equilíbrio, coordenação e aprendizagem motora. Além disso, também foram encontradas diferenças no número de escorregadas dos animais mais jovens (37 e 58 DPN) em relação aos mais velhos (100 DPN) na viga quadrada de maior espessura no BWT. No entanto, este achado não demonstra prejuízo na coordenação motora e equilíbrio de ratas *Wistar* na fase da adolescência, e sim, decorrente da maior impulsividade e excitabilidade características desta fase manifestadas diante da realização de uma tarefa de menor grau de dificuldade (SPEAR, 2000; GUERRI e PASCUAL, 2010; SPEAR e SWARTZWELDER, 2014).

O período da adolescência é caracterizado por aumento da busca de sensações, comportamentos de risco, baixos níveis de prevenção de danos, impulsividade e ansiedade (GUERRI e PASCUAL, 2010; PASCUAL et al., 2011; SELEMON, 2013). Os animais controle na fase de periadolescência, deste estudo, apresentaram comportamento natural semelhante à ansiedade evidenciado pela maior aversão a espaços abertos nos testes do campo aberto e LCE em relação aos adultos.

Esta característica negativa do comportamento entre adolescentes é consequência da maturação tardia de componentes corticais e subcorticais como áreas do sistema límbico (ex. amígdala, hipocampo, núcleo accumbens, hipotálamo) envolvidos em funções executivas como controle do impulso, atenção, inibição da resposta e planejamento de tarefas (SPEAR, 2000; CREWS et al., 2007; GUERRI e PASCUAL, 2010; ARAIN et al., 2013). Desta forma, há maior vulnerabilidade dos adolescentes ao abuso de substâncias psicotrópicas como o EtOH (GUERRI e PASCUAL, 2010).

Alguns autores têm descrito que o EtOH está associado com algumas morbidades como medo, ansiedade e depressão (BERTOTTO et al., 2006). Considerando que o córtex pré-frontal e estruturas do sistema límbico são vulneráveis aos efeitos neurotóxicos do álcool, repetidos episódios de *binge drinking* estão relacionados a mudanças neuroadaptativas que podem levar a aumento persistente de sintomas de ansiedade (CREWS et al. 2007; SILBERMAN et al.,

2009; GUERRI e PASCUAL, 2010; SELEMON et al., 2013). Assim, estas diferenças têm sido propostas por refletir a maior tendência no reforço induzido pelo EtOH em indivíduos mais jovens, que podem fundamentar a maior propensão dos adolescentes a se envolverem em condições de abuso do consumo do toxicante (DOREMUS et al., 2005).

Alguns autores sugerem que fêmeas adolescentes são menos sensíveis às alterações associadas ao EtOH dentro dos sistemas cerebrais envolvidos na modulação do comportamento semelhante à ansiedade (VARLINSKAYA et al., 2016). No entanto, em nosso estudo, repetidos episódios de *binge drinking* desde a adolescência à idade adulta gerou redução do número de entrada nos braços abertos do LCE e distância percorrida no centro do aparato do campo aberto, estes achados revelam o comportamento semelhante à ansiedade dos animais EtOH-intoxicado. Vale ressaltar que a ansiedade está associada ao reforço negativo do álcool que podem impulsionar ainda mais repetidos ciclos do consumo excessivo da droga (DE WITTE et al., 2003; BERTOTTO et al., 2006; GILPIN e KOOB, 2008; CREWS e VETRENO, 2014).

As desordens da ansiedade, baseado em estudos experimentais, envolvem circuitos neuronais bem definidos que podem estar associados com desordens de ansiedade específicas ou generalizadas (BRANDÃO et al., 2008). De forma geral, tem sido descrito a importância de regiões límbicas como amígdala e hipocampo com comportamento semelhante à ansiedade (BRANDÃO et al., 2008; VETRENO e CREWS, 2015). Além disso, é conhecido que o pós-consumo crônico de EtOH no modelo *heavy drinking* durante a adolescência à idade adulta aumenta comportamento semelhante à ansiedade em fêmeas associado a alterações morfológicas no hipocampo, como redução do volume hipocampal e populações de células neuronais e glial (OLIVEIRA et al., 2015).

Bertotto et al. (2006) realizaram interrupção abrupta no consumo de EtOH (média de 9,4 g/kg) por 14 dias em ratos adultos, em seguida, os animais foram submetidos ao teste do LCE 8, 48 e 72 h pós-consumo. No entanto, os animais revelaram comportamento do tipo ansiogênico somente no tempo de 8 h do pós-consumo. Contraditoriamente, nossos achados revelaram comportamento tipo ansioso nos animais EtOH-intoxicado na idade adulta mesmo 14 dias após a retirada da droga, dessa forma, este período não foi suficiente para minimizar as alterações sobre o comportamento semelhante à ansiedade derivadas do EtOH no padrão *binge* utilizado em nosso protocolo de estudo. Estas diferenças ressaltam o efeito nocivo do consumo de EtOH no padrão *binge* iniciado na adolescência.

Vale ressaltar que Pascual e colaboradores (2011) relataram comportamento semelhante à ansiedade persistente em adolescentes após 15 dias de retirada do consumo crônico de EtOH após 5 meses intoxicação, associado a dano inflamatório com mudanças epigenéticas mediadas por receptores *toll-like 4*. Além disso, outra investigação sobre os efeitos do consumo de EtOH (4 g/kg, via i.p.) no modelo *binge drinking*, no paradigma 2 dias *on* e 2 dias *off* durante 20 dias, revelou comportamento tipo ansioso em ratos adolescentes e adultos após 12 dias de retirada da droga (VAN SKIKE et al., 2015). Dessa forma, estes achados indicam que a retirada de EtOH após repetidos episódios gera efeito ansiogênico por período prolongado dose e tempo-dependente (ZHANG et al., 2007).

Considerando que os animais EtOH-intoxicado reduziram a atividade locomotora espontânea e que a qualificação da deambulação foi de comportamento semelhante à ansiedade, foi avaliado também a distância percorrida na periferia. É conhecido que o comportamento do animal é influenciado pela tigmotaxia cuja definição é “propensão natural do rato de ficar próximo dos limites de um ambiente novo” que no caso do campo aberto, é o comportamento natural dos animais de ficar próximos às paredes do aparato (ZHENG et al., 2012).

Dessa forma, o comportamento de tigmotaxia dos animais foi preservado, conforme ilustração qualitativa de ocupação dos animais no campo aberto, assim como, não houve diferença quantitativa da distância percorrida pelos mesmos na periferia do aparato. No entanto, foi percebido que EtOH em padrão *binge*, em nosso protocolo, gerou aumento temporário no tempo de imobilidade destes animais durante a exploração de um aparato não familiar.

O aumento de eventos de imobilidade do animal no aparato é um parâmetro amplamente utilizado como indicativo de alto grau de estresse (WALSH e CULMMINS, 1979; KARL et al., 2003). Além disso, a hipoatividade locomotora e redução da frequência de *rearings* associadas ao aumento do tempo de imobilidade podem representar um potencial comportamento relacionado ao medo de espaços abertos ou uma redução motivacional de ir ao centro do campo aberto ou ainda uma combinação dos dois fatores (EHLERS et al., 2013; KARADAYIAN et al., 2013).

Tem crescido uma forte evidência sobre a relação entre o estresse, ansiedade e desordens do abuso do álcool em adolescentes (SILBERMAN et al., 2009). A transição do consumo em *binge* para a dependência do EtOH envolve a desregulação dos circuitos que medeiam respostas comportamentais a estressores, não só dos circuitos neurais envolvidos no processo de recompensa. No sistema de estresse, o CRF ativa o eixo HPA fazendo com que o ACTH estimule a glândula adrenal aumentando, assim, a produção de CORT (LOGRIP et al., 2013).

A ativação deste eixo, está associado com elevado estado de ansiedade (GILPIN e KOOB, 2008; WILLEY et al., 2012).

A adolescência é um período de maior plasticidade das respostas do eixo HPA, desta forma, este sistema pode ter importante impacto da vida adulta. Além disso, o consumo de EtOH durante este período crítico do desenvolvimento tem um efeito mais proeminente em fêmeas que em machos quanto adaptações em longo prazo (WILLEY et al., 2012). Um estudo realizado por Logrip e colaboradores (2013) evidenciou que o consumo intermitente de EtOH (alcoolemia de 200 mg%) durante a fase de adolescência (28-42 DPN) de ratos resulta em perturbações permanentes sobre a circuitaria cerebral do eixo HPA na idade adulta (70-71 DPN), principalmente nas fêmeas que apresentaram uma marcante inibição do núcleo paraventricular hipotalâmico.

Adicionado a isso, Chu et al. (2007) tem reportado que o aumento da ingestão em animais dependentes de EtOH poderia ser reduzida significativamente pelos tratamentos com antagonistas do receptor de CRF do receptor (CRF1-R) associado à atenuação do comportamento tipo ansiedade, independentemente da idade ou sexo. Nossos achados demonstram que os níveis de CORT sanguíneo foram elevados pós-consumo intermitente e episódico de EtOH em todos os períodos estudados.

Dentre os objetivos deste estudo está a caracterização das alterações comportamentais e bioquímicas decorrentes de um novo paradigma do consumo intermitente e episódico de EtOH da adolescência à idade adulta elucidando os prejuízos imediatos e em longo prazo. No entanto, vale ressaltar que este estudo é de importante relevância nas investigações relacionadas às desordens de abuso do álcool na adolescência, haja vista que encontramos associações importantes em todos os períodos estudados. Tais como níveis elevados de hormônio CORT desde o pós-consumo intermitente e episódico de EtOH na adolescência que perdurou por tempo prolongado na idade adulta, assim como, o aumento da ocorrência de comportamento semelhante à ansiedade persistente. Esta elevação pode perturbar o funcionamento normal do hipocampo (CREGO et al., 2010; GUERRI e PASCUAL, 2010).

A tarefa de reconhecimento de objeto é amplamente reconhecida como uma tarefa de memória de trabalho, que é facilitada pela tendência natural do rato para a novidade e avalia a capacidade de discriminação entre objetos familiares e não familiares (PIRES et al., 2009; TAKAHASHI et al., 2015). É bem estabelecido que doses elevadas de álcool administradas em

curto período de tempo (3 a 4 dias), em um simples ciclo de *binge*, produza neurotoxicidade em áreas córtico-límbicas - incluindo bulbo olfatório, giro dentado do hipocampo e córtex entorrinal - estas últimas, fazem conexões importantes podendo estar envolvidas na identificação de novos objetos (CREWS et al., 2000; CIPPITELLI et al., 2010).

Além disso, Pascual e colaboradores (2007) sugeriram que os prejuízos encontrados na memória discriminativa de objetos em ratos adolescentes após exposição ao EtOH na forma de *binge* podem estar associados a danos hipocampal e cortical. Está bem descrito na literatura que o hipocampo é uma das regiões mais vulneráveis aos efeitos neurotóxicos induzidos pelo EtOH, assim como, ratos adolescentes são mais sensíveis que os adultos aos prejuízos mnemônicos decorrentes do consumo do álcool (WARD et al., 2009; GUERRI e PASCUAL, 2010; YANG et al., 2014).

Assim, nossos achados demonstram que as ratas adolescentes pós-consumo intermitente e episódico de EtOH não discriminaram os objetos com diferenças estruturais, resultado este evidenciado pelo baixo índice de reconhecimento do novo objeto. Como não houve alteração no tempo de investigação nos objetos idênticos na fase de treino, nossos achados revelam prejuízo na memória não-espacial - de curta duração - de reconhecimento de objeto decorrente da administração do EtOH e não secundariamente advinda da alteração da atividade locomotora encontrada neste estudo (TAKAHASHI et al., 2015).

Existem evidências de que alguns efeitos cognitivos induzidos por repetidos episódios de EtOH em ratos adolescentes, como prejuízo na aprendizagem, possam persistir até à idade adulta (PASCUAL et al., 2007; PASCUAL et al., 2011; CIPPITELLI et al., 2010). Além disso, também tem sido relatado que o consumo intermitente de álcool causa prejuízos na memória espacial e não-espacial na tarefa de reconhecimento de objeto em roedores adolescentes e adultos (PASCUAL et al., 2007; PASCUAL et al., 2011; CIPPITELLI et al., 2010; ZHAO et al., 2013). Vale ressaltar que repetidos episódios de EtOH a doses que levem níveis de alcoolemia a partir de 80 mg/dL e 200 mg/dL, são conhecidos por gerar prejuízo mnemônico (KUZMIN et al., 2012).

Apesar de estar bem descrito os prejuízos mnemônicos decorrentes do *binge drinking*, em contrapartida, a possibilidade de recuperação desta função durante a abstinência permanece obscura. Em nossos achados, o prejuízo na memória de curta duração na tarefa de reconhecimento de objeto decorrente de repetidos episódios de EtOH da adolescência à idade adulta não perdurou após 14 dias de abstinência. Da mesma forma, estudos sobre o uso do EtOH em altas doses de forma intermitente e episódica revelaram prejuízo temporário na

memória não-espacial de reconhecimento do objeto no qual foi gradualmente recuperado após longo prazo de abstinência, 14 e 30 dias (CIPPITELLI et al., 2010; ZHAO et al., 2013).

Por outro lado, outros trabalhos têm relatado que o consumo de EtOH contínuo (3,4 g/kg por 6 dias) ou intermitente e episódico (5 g/kg, 2 dias *on* e 2 *off*, durante 30 dias) em adolescentes gera prejuízo na memória não-espacial de reconhecimento de objeto sem recuperação do dano após 3 e 25 dias da retirada da droga, respectivamente (TAKAHASHI et al., 2015; VETRENO e CREWS, 2015). Notavelmente, a dose, tempo e duração do consumo de EtOH são determinantes para a recuperação dos prejuízos na memória hipocampo-dependente após abstinência (CIPPITELLI et al., 2010).

Adicionado ao aumento da ansiedade, o período da adolescência é momento de comportamento de alto risco e aumento da exploração (STANSFIELD e KIRSTEIN, 2005; STANSFIELD e KIRSTEIN, 2007). Stansfield e Kirstein (2005) utilizaram um novo protocolo para avaliar comportamentos impulsivo e de preferência por novidade entre ratos adolescentes (35 DPN) e adultos (60 DPN). Os autores encontraram que os animais adolescentes apresentaram maior tempo de investigação nos objetos num ambiente anteriormente conhecido. De fato, neste estudo, os animais na fase da periadolescência gastaram mais tempo investigando os objetos num ambiente anteriormente habitado, este achado reflete a maior curiosidade neste período do desenvolvimento.

Vale ressaltar que a adolescência é o período do desenvolvimento marcado pela neuroplasticidade na qual refere-se às possíveis mudanças neuronais significativas que ocorrem na aquisição de novas tarefas (ARAIN et al., 2013). Além disso, esta habilidade encontra-se aumentada nesta fase da vida particularmente pelos níveis elevados de neurogênese hipocampal nos quais novos circuitos funcionais são formados (BRIONES e WOODS, 2013; MCCLAIN et al., 2013; VETRENO e CREWS, 2015). Ademais, muitos acreditam que a estrutura e a função do hipocampo dependem das células progenitoras neurais presentes na zona subgranular do giro denteado e o seu papel na neurogênese constitutiva (KEMPERMANN et al., 2004, IMAYOSHI et al., 2008; KEMPERMANN et al., 2016).

O BDNF é um fator neurotrófico envolvido na migração de células progenitoras neurais presentes na zona subgranular do giro denteado do hipocampo e tem um papel essencial em eventos de plasticidade neuronal e funções importantes como aprendizado e memória (TYLER et al., 2002; SCHARFMAN et al., 2005). Também já foi descrito que esta neurotrofina é importante para a sobrevivência neuronal e manutenção do fenótipo estrutural e neuroquímico de neurônios hipocampais (KULKARNY et al., 2011).

Repetidos episódios do consumo de EtOH da adolescência à fase adulta, em nosso protocolo, reduziu o imunocontéudo de BDNF no hipocampo. Diminuição da atividade dessa neurotrofina pode estar envolvida em processos de neurodegeneração relacionados ao consumo de EtOH (DAVIS, 2008). Além disso, tem sido descrito que o consumo do álcool durante o desenvolvimento cerebral induz apoptose e prejudica a migração neuronal, resultando em hiperatividade, aumento da impulsividade e déficits mnemônicos e motores (MUKHERJEE et al., 2006).

É conhecido a importância do BDNF na plasticidade hipocampal facilitando aprendizado e memória (TYLER et al., 2002; SCHARFMAN et al., 2005; KULKARNY et al., 2011). No entanto, é surpreendente que poucos estudos descrevam diretamente os efeitos do EtOH sobre a sinalização de BDNF, principalmente envolvendo a relação da neurotrofina vs. binge drinking vs. prejuízo mnemônico. Em nosso estudo, houve correlação da redução de imunocontéudo de BDNF com o prejuízo mnemônico encontrado identificado pelo baixo índice de reconhecimento na fase de teste da tarefa de reconhecimento de objeto em relação aos animais EtOH-intoxicado da adolescência à idade adulta.

A respeito da quantidade de BDNF no hipocampo dos animais submetidos a nosso protocolo de *binge drinking*, não foi encontrada diferença da quantidade de imunocontéudo da neurotrofina 14 dias após a retirada da droga, assim como, não foi encontrado prejuízo na tarefa de reconhecimento de objeto no mesmo período estudado. Esses resultados demonstram a importância dos níveis de BDNF hipocampal para o processo mnemônico, assim como, é um forte indicativo que esta neurotrofina é a responsável pela recuperação funcional encontrada.

Briones e Woods (2013) encontraram reduzidos níveis de BDNF no hipocampo de ratos adolescentes 8 dias após o consumo de EtOH em um paradigma de *binge drinking* por 12 dias. Em contrapartida, outro estudo demonstrou que o consumo de EtOH (5 g/kg, via intragástrica, a cada 8 horas por 4 dias) não alterou a quantidade de BDNF no hipocampo em ratos adolescentes em 2, 7 e 14 dias pós-consumo (MCCLAIN et al., 2013). Neste estudo, por sua vez, também não foi encontrada diferença da quantidade da neurotrofina 14 dias após repetidos *binges* desde a adolescência. Estas diversidades nos resultados podem ser devido aos diferentes protocolos utilizados, mas nos reflete a busca de retorno à homeostasia do sistema após distúrbio fisiológico, de certa forma, o êxito da recuperação depende da extensão do dano causado.

Diante das disfunções encontradas sobre o comportamento motor, comportamento semelhante à ansiedade e no processo mnemônico de ratas decorrente do consumo intermitente e episódico de EtOH, o balanço oxidativo sistêmico no mesmo paradigma foi estudado. O

estresse oxidativo refere-se ao aumento da liberação de ROS e/ou depleção do sistema de defesa antioxidante resultando em desequilíbrio oxidativo entre os sistemas pró e antioxidante, cujas as principais consequências são a oxidação de lipídeos, proteínas e DNA gerando dano celular (VASCONCELOS et al., 2007; NOGALES et al., 2014).

Os efeitos nocivos do EtOH são manifestados pela liberação de radicais livres ou por outros mecanismos que contribuem para promover dano oxidativo reforçado (OSTROWSKA et al., 2004). É conhecido que o consumo crônico de EtOH diminui fatores antioxidantes como as enzimas catalase e SOD, além disso, essas mudanças geram, entre outros efeitos, o aumento da peroxidação lipídica (OSTROWSKA et al., 2004). Por outro lado, Nogales e colaboradores (2014) descreveram que os níveis de MDA e das enzimas catalase e SOD encontram-se elevados 24 horas após o consumo intermitente e episódico de EtOH (3 g/kg, 3 dias consecutivos durante 3 semanas) em ratos adolescentes (28-47 DPN).

Em nosso estudo, foi realizado pela primeira vez os efeitos do *binge drinking* sobre o balanço oxidativo em importantes períodos do desenvolvimento de ratos fêmeas adolescentes, assim como, em longo prazo na fase adulta. Os resultados encontrados revelam a alta atividade enzimática do sistema antioxidante pelo aumento das enzimas catalase e SOD após a administração de *binge drinking* agudo, esta eficiência enzimática gerou redução da peroxidação lipídica. Além disso, a continuidade de repetidos episódios de EtOH gera uma redução gradual da atividade enzimática com concomitante elevação dos níveis de MDA culminando na peroxidação lipídica.

O metabolismo majoritário de EtOH ocorre no fígado, sendo que a principal via de metabolização é por meio da ADH que realiza a conversão do álcool em acetaldeído e a ALDH, por sua vez, converte o acetaldeído em acetato. Estes processos aumentam os níveis de EROs, incluindo radical superóxido, radical hidroxila e peróxido de hidrogênio que contribuem com distúrbios no balanço oxidativo e podem causar dano celular gerando em tecido nervoso, dano na barreira hematoencefálica, neuroinflamação e doenças neurológicas (HAORAH et al., 2008a, 2008b; ZAKHARI, 2006).

Todos os tecidos, incluindo SNC, têm a capacidade de neutralizar os radicais de oxigênio por mecanismos antioxidantes que incluem a atividade enzimática da SOD e catalase, estas enzimas convertem o ânion superóxido em peróxido de hidrogênio e peróxido de hidrogênio em água, respectivamente (VASCONCELOS et al., 2007).

Ostojic e colaboradores (2012) relacionaram o aumento da atividade da SOD à prevenção de danos na mitocôndria provocados pela administração intermitente e episódica de EtOH (5 doses via intragástrica, 2 g/ kg a cada 12 horas). Em nosso estudo, o *binge drinking* agudo na adolescência parece ter estimulado a prevenção de dano mitocondrial, no entanto, a atividade enzimática da SOD foi reduzida após repetidos episódios do consumo de EtOH na idade adulta, em seguida, foi encontrado uma adaptação do sistema enzimático ao *binge drinking* crônico.

Além de atuar no sistema antioxidante, a catalase também pode atuar no metabolismo do EtOH como uma rota alternativa que necessita de peróxido de hidrogênio para oxidar o álcool e produzir acetaldeído (CEDERBAUM, 2012). Em contrapartida, esta via do metabolismo é constituída por não mais do que 2% do metabolismo hepático de EtOH, no entanto, tem sido atribuída à catalase uma importante função na via de oxidação de EtOH no cérebro (VONGHIA et al., 2008; CORREA et al., 2006).

Nossos achados demonstram que o *binge drinking* agudo na adolescência estimulou a atividade enzimática da catalase provavelmente como consequência da elevação dos níveis de peróxido de hidrogênio proveniente da reação enzimática da SOD. Por conseguinte, com a redução da atividade da SOD, os níveis de catalase foram gradualmente declinando. A efetiva redução da catalase foi observada somente após 2 meses de *binge drinking* crônico na idade adulta.

Vale ressaltar, que o excesso de espécies reativas pode provocar oxidação de lipídeos liberando MDA, este é o produto final da peroxidação lipídica de ácidos graxos poli-insaturados. Estes lipídeos são susceptíveis ao ataque oxidativo tipicamente por EROs, sendo assim, o MDA é um biomarcador para este tipo de dano e indicativo de liberação excessiva de EROs (LIU et al., 2011; YANG ET AL., 2015). Desta forma, nossos achados demonstram uma passageira proteção às membranas pela intensa atividade do sistema enzimático antioxidante frente ao *binge drinking* agudo, no entanto, o aparente esgotamento e falência do sistema enzimático após repetidos episódios de EtOH culmina em peroxidação lipídica. No entanto, no período de 14 dias sem administração, estas alterações retornam à normalidade.

VIII CONSIDERAÇÕES FINAIS

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo demonstrou que o modelo de consumo de álcool usual entre os adolescentes, que consiste de elevado consumo de EtOH no padrão intermitente e episódico, ou em *binge drinking*, da adolescência à fase adulta induz prejuízos funcionais tais como, redução da atividade locomotora exploratória, prejuízo na coordenação motora, equilíbrio e aprendizagem motora associados à lentidão nos movimentos, assim como, prejuízo no processo mnemônico e aumento de comportamento semelhante à ansiedade. Estes prejuízos foram acompanhados de alterações bioquímicas como elevação dos níveis do hormônio CORT, redução da quantidade de imunocónteuído de BDNF no hipocampo e dano no balanço oxidativo sistêmico.

Além disso, foi realizado pela primeira vez períodos de recorte em importantes fases do desenvolvimento de ratos fêmeas da adolescência à idade adulta durante repetidos episódios de *binge drinking*. Dessa forma, foi possível identificar que os prejuízos encontrados sobre o comportamento semelhante à ansiedade, memória de curta duração, bradicinesia e atividade locomotora espontânea apareceram desde a administração de EtOH por três dias consecutivos, no entanto, não apresentaram piora do dano após repetidos episódios. Ademais, não houve recuperação destes prejuízos em longo prazo (14 dias sem administração após 8 BD), exceto sobre a memória de curta duração de reconhecimento de objeto associado ao retorno dos níveis normais de BDNF.

Vale ressaltar que este estudo de repetidos episódios de *binge drinking* em recortes, revelou a piora na função motora principalmente deflagrado pelo déficit no aprendizado motor na fase adulto jovem com uma recuperação gradual e parcial após período prolongado de retirada da droga. No entanto, o prejuízo da coordenação motora e equilíbrio permaneceram.

Assim, a administração intermitente e episódica de elevada quantidade de EtOH altera a homeostasia e funções especializadas do SNC. Estes efeitos nocivos são mais proeminentes durante o período da adolescência, no entanto, são necessárias mais investigações sobre por quanto tempo perduram os danos encontrados em cada recorte de *binge drinking* realizado neste estudo. Assim como, o surgimento de novos prejuízos ou cessação ou adaptação funcional em outras áreas comportamentais, além de investigação da recuperação durante mais períodos de abstinência na fase adulta e mecanismos envolvidos. Por fim, futuras investigações devem ser elucidadas principalmente no público feminino que é uma população com alto consumo de EtOH, mas negligenciada em estudos experimentais.

IX REFERÊNCIAS

9. REFERÊNCIAS

- ACEVEDO, M.B.; NIZHNIKOV, M.E.; MOLINA, J.C.; PAUTASSI, R.M. Relationship between ethanol-induced activity and anxiolysis in the open field, elevated plus maze, light-dark box, and ethanol intake in adolescent rats. *Behavioural Brain Research*. 2014; 265: 203–215.
- ACEVEDO, M.B.; PAUTASSI, R.M.; SPEAR, N.E.; SPEAR, L.P. Age-dependent effects of stress on ethanol-induced motor activity in rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 2013; 230: 389–98.
- ADAMS, C. L.; SHORT, J. L.; & LAWRENCE, A. J. Cue-conditioned alcohol seeking in rats following abstinence: involvement of metabotropic glutamate 5 receptors. *Brit J Pharmacol*. 2010; 159: 534–542.
- AEBI, H. Oxygen Radicals in Biological Systems. *Methods in Enzymology*. 1947; 105: 121–126.
- AGUIAR, M.S.S. Análise do comportamento defensivo induzido pela microinjeção do neuropeptídeo substância P na matéria cinzenta periaquedutal dorsal de ratos. Departamento de Psicologia e Educação, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo; 1995.
- AMANO, O., MIZOBE, K., BANDO, Y.; SAKIYAMA, K. Anatomy and histology of rodent and human major salivary glands. *Acta Histochem. Cytochem*. 2012; 45: 241–250.
- ANKARCRONA, M.; DYPBUKT, J.M.; BONFOCO, E.; ZHIVOTOVSKY, B.; ORRENIUS, S.; LIPTON, S.N.P. Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron*. 1995; 15: 961-973.
- ANTZOULATOS, E.; JAKOWEC, M.W.; PETZINGER, G.M.; WOOD, R.I. Sex differences in motor behavior in the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Pharma. Biochem and Behav*. 2010; 95: 466 – 472.
- ARADAYIANA, A.G.; BUSSOB, M.J.; FELEDERC, C.; CUTRERA, R.A. Alterations in affective behavior during the time course of alcohol hangover. *Behavioural Brain Research*. 2013; 253: 128– 138.
- ARAIN, M.; HAQUE, M.; JOHAL, L.; MATHUR, P.; NEL, W.; RAIS, A.; SANDHU, R.; SHARMA, S. Maturation of the adolescent brain. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*. 2013; 9: 449–461.
- BAHI, A. Individual differences in elevated plus-maze exploration predicted higher ethanol consumption and preference in outbred mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 2013; 105: 83-88.

BAKER, K.; HARDING, A.; HALLIDAY, G.; KRIL, J.J.; HARPER, C. Neuronal loss in functional zones of the cerebellum of chronic alcoholics with and without Wernicke's encephalopathy. *Neuroscience*. 1999; 91: 429-438.

BAKER, K.G.; HARDING, A.J.; HALLIDAY, G.M.; KRIL, J.J.; HARPER, C.G. Neuronal loss in functional zones of the cerebellum of chronic alcoholics with and without wernicke's encephalopathy. *Neuroscience*. 1999; 91: 429-438.

BANDERAS, J.A., GAITAN, L.A., PORTILLA, J.; AGUIRRE, A. Effects of chronic ethanol consumption on the rat parotid gland. *Arch. Oral Biol*. 1992; 37: 69-72.

BANNACH, S.V.; TEIXEIRA, F.B.; FERNANDES, L.M.; FERREIRA, R.O.; SANTANA, L.N.; FONTES-JÚNIOR, E.A.; OLIVEIRA, G.B.; PREDIGER, R.D. Alveolar bone loss induced by chronic ethanol consumption from adolescence to adulthood in Wistar. *Indian J Exp Biol*. 2015; 53(2): 93-7.

BARKER, G. R. I; WARBURTON, E. C. When is the hippocampus involved in recognition memory? *Journal of Neuroscience*, 2011; 31:10721-10731.

BEETS, M.W.; FLAY, B.R.; VUCHINICH, S.; LI, K.; ACOCK, A.; SNYDER, F.J. Longitudinal patterns of binge drinking among first year college students with a history of tobacco use. *Drug Alcohol Depend*. 2009; 103: 1-8.

BERLIOCCHI, L.; BANO, D.; NICOTERA, P. Ca²⁺ signals and death programmes in neurons. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci*. 2005; 360: 2255-2258.

BERTOTTO, M.E.; BUSTOS, S.G.; MOLINA, V.A.; MARTIJENA, I.D. Influence of ethanol withdrawal on fear memory: effect of d-cycloserine. *Neuroscience*. 2006; 142: 979-990.

BIGGIO, G.; CONCAS, A.; FOLLESA, P.; SANNA, E.; SERRA, M. Stress, ethanol, and neuroactive steroids. *Pharmacology Therapeutics*. 2007; 116:140-171.

BLOOM, F.E.; IVERSEN, L.L. Localizing 3H-GABA in nerve terminals of rat cerebral CORTex by electron microscopic autoradiography. *Nature*. 1971; 229: 628-630.

BONTHIUS, D.J.; WEST, J.R. Alcohol-induced neuronal loss in developing rats: increased brain damage with binge exposure. *Alcohol Clin Exp Res*. 1990; 14:107-118.

BOTTA, P.; MAMELI, M.; FLOYD, K.L.; RADCLIFFE, R.A.; VALENZUELA, C.F. Ethanol sensitivity of GABAergic currents in cerebellar granule neurons is not increased by a single amino acid change (R100Q) in the alpha6 GABA receptor subunit. *J Pharmacol Exp Ther*. 2007; 323: 684-691.

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

BRANDÃO, M.L.; ZANOVELI, J.M.; RUIZ-MARTINEZ, R.C.; OLIVEIRA, L.C.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J. Different patterns of freezing behavior organized in the

periaqueductal gray of rats: Association with different types of anxiety. *Behavioural Brain Research*. 2008; 188: 1–13.

BRENES, J.C.; PADILLA, M.; FORNAGUERA, J. A detailed analysis of open-field habituation and behavioral and neurochemical antidepressant-like effects in postweaning enriched rats. *Behavioural Brain Research*. 2009; 197: 125–137.

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*. 2013; 254: 324–334.

BROOKES, P.S. Mitochondrial nitric oxid synthase. *Mitochondrion*. 2004; 3: 187-204.

BROOKS, D.J. Functional imaging of Parkinson's disease: is it possible to detect brain areas for specific symptoms? *J Neural Transm Suppl*. 1999; 56:139-53.

BUKOWSKA, B.; KOWALSKA, S. Phenol and catechol induce prehemolytic and hemolytic changes in human erythrocytes. *Toxicology Letters*. 2004; 152: 73–84.

BURGESS, K.L., DARDICK, I., CUMMINS, M.M.; BURFORD-MASON, A.P., BASSETT, R.; BROWN, D.H. Myoepithelial cells actively proliferate during atrophy of rat parotid gland. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod*. 1996; 82: 674-680.

BURGESS, K.L.; DARDICK, I. Cell population changes during atrophy and regeneration of rat parotid gland. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod*. 1998; 85: 699-706.

CAGETTI, E.; LIANG, J.; SPIGELMAN, I.; OLSEN, R.W. Withdrawal from chronic intermittent ethanol treatment changes subunit composition, reduces synaptic function, and decreases behavioral responses to positive allosteric modulators of GABAA receptors. *Mol Pharmacol*. 2003; 63: 53-64.

CAMPANA, A.O., BURINI, R.C., OUTA, A.Y.; DE CAMARGO, J.L. Experimental protein deficiency in adult rats. *Rev. Bras. Pesqui. Med. Biol*. 1975; 8: 221-226.

CAMPOS, S.C.G., MOREIRA, D.A.C., NUNES, T.D.S., COLEPICOLO, P.; BRIGAGÃO, M.R.P.L. Oxidative stress in alcohol-induced rat parotid sialadenosis. *Arch. Oral Biol*. 2005; 50: 661-668.

CARDA, C., CARRANZA, M., ARRIAGA, A., DÍAZ, A., PEYDRÓ, A.; GOMEZ, F.M. Structural differences between alcoholic and diabetic parotid sialosis. *Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal*. 2005; 10:, 309-314.

CARRANZA, M., FERRARIS, M.E.; GALIZZI, M. Structural and morphometrical study in glandular parenchyma from alcoholic sialosis. *J. Oral Pathol. Med*. 2005; 34: 374-379.

CARTER, R.J.; LIONE, L.A.; HUMBY, T.; MANGIARINI, L.; MAHAL, A.; BATES, G.P.; DUNNETT, S.B.; MORTON, A.J. Characterization of progressive motor deficits in mice transgenic for the human Huntington's disease mutation. *J Neuroscience*. 1999; 19(8): 3248-57.

CARTER, R.J.; LIONE, L.A.; HUMBY, T.; MANGIARINI, L.; MAHAL, A.; DUNNETT, S.B.; MORTON, A.J. Characterization of Progressive Motor Deficits in Mice Transgenic for the Human Huntington's Disease Mutation. *Journal of Neuroscience*. 1999; 19: 3248-3257.

CASILLAS-ESPINOSA, P. M.; POWELL, K. L. AND O'BRIEN, T. J. Regulators of synaptic transmission: Roles in the pathogenesis and treatment of epilepsy. *Epilepsia*. 2012; 53: 41–58.

CEDERBAUM, A.I. Alcohol metabolism. *Clinics in liver Disease*. 2012; 16(4): 667-685.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION 2009. Youth risk behavior survey. Disponível em: < www.cdc.gov/yrbss>. Acesso em: 05 de Maio de 2014.

CENTRO DE INFORMAÇÕES SOBRE SAÚDE E ÁLCOOL (CISA). Metabolismo do álcool. Disponível em: <<http://www.cisa.org.br/artigo/5536/metabolismo-alcool.php>>. Acesso em: 12 de outubro 2016.

CHESTER, J.A.; RAUSCH, E.J.; JUNE, H.L.; FROEHLICH, J.C. Decreased reward during acute alcohol withdrawal in rats selectively bred for low alcohol drinking. *Alcohol ClinExp Res*. 2006; 38:165–172.

CHESTER, J.A.; RAUSCH, E.J; JUNE, H.L.; FROEHLICH, J.C. Decreased reward during acute alcohol withdrawal in rats selectively bred for low alcohol drinking. *Alcohol ClinExp Res*. 2006; 38:165–172.

CHU, K.; KOOB, G.F.; COLE, M.; ZORRILHA, E.P.; ROBERTS, A.J. Dependence-induced increases in ethanol self-administration in mice are blocked by the CRF1 receptor antagonist antalarmin and by CRF1 receptor knockout. *Pharmacol Biochem Behav*. 2007; 86(4): 813-821.

CHUCK, T.L.; MCLAUGHLIN, P.J.; ARIZZI-LAFRANCE, M.N.; SALAMONE, J.D.; CORREA, M. Comparison between multiple behavioral effects of peripheral ethanol administration in rats: Sedation, ataxia, and bradykinesia. *Life Sciences*. 2006; 79: 154–161 .

CIPPITELLI, A.; ZOOK, M.; BELL, L.; DAMADZIC, R.; ESKAY, R.L.; SCHWANDT, M.; HEILIG, M. Reversibility of object recognition but not spatial memory impairment following binge-like alcohol exposure in rats. *Neurobiology of Learning and Memory*. 2010; 94: 538–546.

CRABBE, J. C.; WAHLSTEN, D.; DUDEK, B. C. Genetics of mouse behavior: interactions with laboratory environment. *Science*. 1999; 284: 1670-1672.

CRABBE, J.C.; METTEN, P.; Yu, C.H.; SCHLUMBOHM, J.P.; CAMERON, A.J., WAHLSTEN, D. Genotypic differences in ethanol sensitivity in two tests of motor incoordination. *Journal of Applied Physiology*. 2003; 95: 1338–1351.

CREGO, A.; HOLGUI'N, S.R.; PARADA, M.; MOTA, N.; CORRAL, M.; CADAVEIRA, F. Binge drinking affects attentional and visual working memory processing in young university students. *Alcohol ClinExp Res*. 2009; 33:1870–9.

CREGO, A.; RODRIGUEZ-HOLGUÍN, S.; PARADA, M.; MOTA, N.; CORRAL, M.; CADAVEIRA, F. Reduced anterior prefrontal CORTex activation in young binge drinkers during a visual working memory task. *Drug Alcohol Depend.* 2010; 109: 45-56.

CREWS, F. T.; BRAUN, C.J.; HOPLIGHT, B.; SWITZER, R. C.; KNAPP, D.J. Binge ethanol consumption causes differential brain damage in young adolescent rats compared with adult rats. *Alcoholism-Clinical and Experimental Research.* 2000; 24:1712–1723.

CREWS, F.; HE, J.; HODGE, C. Adolescent CORTical development: A critical period of vulnerability for addiction. *Pharmacol Biochem Behav* 2007; 86: 189–199.

CREWS, F.; NIXON, K.; KIM, D.; JOSEPH, J.; SHUKITT-HALE, B.; QIN, L.; ZOU, J. BHT blocks NFkappaB activation and ethanol-induced brain damage. *Alcoholism Clinical and Experimental Research.* 2006; 30:1938–1949.

CREWS, F.T.; BRAUN, C.J. Binge ethanol treatment causes greater brain damage in alcohol-preferring p rats than in alcohol non preferring in rats. *Alcohol ClinExp Res.* 2003; 27:1075–82.

CREWS, F.T.; NIXON, K. Mechanisms of neurodegeneration and regeneration in alcoholism. *Alcohol and Alcoholism,* 2008; 44:115–127.

CREWS, F.T.; NIXON, K.; WILKE, M.B. Exercise reverses ethanol inhibition of neural stem cell proliferation. *Alcohol.* 2004; 33: 1–9.

CUZON, V.C.; YEH, P.W.; YANAGAWA, Y.; OBATA, K.; YEH, H.H. Ethanol consumption during early pregnancy alters the disposition of tangentially migrating GABAergic interneurons in the fetal córtex. *J Neurosci.* 2008; 28: 1854-1864.

DALE, A.C. *Histologia bucal: desenvolvimento, estrutura e função.* Rio de Janeiro. Guanabara Koogan. 2001.

DAVIS, M; .I. Ethanol-BDNF interations: still more questions than answers. *Pharmacol Ther.* 2008; 118: 36-57.

DE WITTE, P. Imbalance between neuroexcitatory and neuroinhibitory amino acids causes craving for ethanol. *Addict Behav.* 2004; 29: 1325-1339.

DEHAYE, J.P.; TURNER, R.J. Isolation and characterization of rat submandibular intralobular ducts. *Am. J. Physiol.* 1991; 261: 490-496.

DIGUET, E., FERNAGUT, P.O.; SCHERFLER, C.; WENNING, G.; TISON, F. Effects of riluzole on combined MPTP + 3-nitropropionic acid-induced mild to moderate striatonigral degeneration in mice. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol.* 1985; 50: 435-41.

DIKRANIAN, K.; Qin, Y.Q.; LABRUYERE, J.; NEMMERS, B.; OLNEY, J.W. Ethanolinduced neruoapoptosis in the developing rodent cerebellum and related brain stem structures. *Developmental Brain Research.* 2005; 155:1-13.

DONOVAN, J.E. Estimated Blood Alcohol Concentrations for Child and Adolescent Drinking and Their Implications for Screening Instruments. *Pediatrics*. 2009: 123.

DOREMUS, T.L.; BRUNELL, S.C.; RAJENDRAN, P.; SPEAR, L.P. Factors influencing elevated ethanol consumption in adolescent relative to adult rats. *Alcohol Clin Exp Res*. 2005; 29: 1796–808.

DUNHAM, N.W.; MIYA, T.S. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. *J Am Pharm*. 1957; 46: 208-209.

EHLERS, C.L.; LIU, W.; WILLS, D.N.; CREWS, F.T. Periadolescent ethanol vapor exposure persistently reduces measures of hippocampal neurogenesis that are associated with behavioral outcomes in adulthood. *Neuroscience*. 2013; 244: 1–15.

ELLIOTT, E.J.; BOWER, C. Alcohol and pregnancy: the pivotal role of the obstetrician. *Aust N Z J Obstet. Gynaecol*. 2008; 48: 236-239.

ENNACEUR A.; DELACOUR, J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behavioural Brain Research*. 1988; 31: 47-59.

ENOCH, M.A. The Role of GABAA Receptors in the Development of Alcoholism. *Pharmacol. Biochem. Behav*. 2008; 90: 95–104.

FERNANDES, L.M.P.; TEIXEIRA, F.B.; JUNIOR, S.M.A.; PINHEIRO, J.J.V.; MAIA, C.S.F.; LIMA, R.R. Immunohistochemical changes and atrophy after chronic ethanol intoxication in rat salivary glands. *Histol Histopathol*. 2015; 30: 1069-1078.

FONTES-JÚNIOR, E.A.; MAIA, C.S.F.; FERNANDES, L.M.P.; GOMES-LEAL, W.; COSTA-MALAQUIAS, A.; LIMA, R.R.; PREDIGER, R.D.; CRESPO-LÓPEZ, M.H. Chronic Alcohol Intoxication and Cortical Ischemia: Study of Their Comorbidity and the Protective Effects of Minocycline. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2016; 10: 1-11.

FORBES, A.; COOZE, J.; MALONE, C.; FRENCH, V.; WEBER, J.T. Effects of intermittent binge alcohol exposure on long-term motor function in young rats. *Alcohol*. 2013; 47: 95-102.

FRADETTE, J., GERMAIN, L., SESHIAH, P.; COULOMBE, P.A. The type I keratin 19 possesses distinct and context-dependent assembly properties. *J. Biol. Chem*. 1998; 276: 35176-35184.

GARCÍA-MORENO, L.M.; CIMADEVILLA, J.M. Acute and chronic ethanol intake: Effects on spatial and non-spatial memory in rats. *Alcohol* 2012; 46: 757-762.

GASS, J.T.; OLIVE, M.F. Glutamatergic substrates of drug addiction and alcoholism. *Biochem Pharmacol*. 2008; 75: 218-265.

GILL, J.S. Reported levels of alcohol consumption and binge drinking within the UK undergraduate student population over the last 25 years. *Alcohol Alcohol*. 2002; 37: 109–120.

GILPIN, N. W.; KOOB, G. F. Neurobiology of Alcohol Dependence. *Alcohol Research & Health*. 2008; 31, 185-195.

GILPIN, N.W.; KOOB, G.F. Overview: Neurobiology of alcohol dependence with a focus on motivation mechanisms. *Alcohol Res Health*. 2008; 31: 185-195.

GOLDSTEIN, L.B.; DAVIS, J.N. Beam-walking in rats: studies towards developing an animal model of functional recovery after brain injury. *J Neurosci Meth*. 1990; 31: 101–107.

GOLOVKO, A.I.; GOLOVKO, S.I.; LEONTIEVA, L.V.; ZEFIROV, S.Y. The Influence of Ethanol on the Functional Status of GABAA Receptors. *Biochem*. 2002; 67: 719-729.

GOULLÉ, J.P.; GUERBET, M. Pharmacokinetics, metabolism, and analytical methods of ethanol. *Annales Pharmaceutiques Françaises*. 2015; 73: 313-322.

GRAFTON, S.T. Contributions of functional imaging to understanding parkinsonian symptoms. *Current Opinion in Neurobiology*. 2004; 14: 715–719.

GRAHAM, K.; WILSNACK, R.; DAWSON, D.; VOGELTANZ, N. Should alcohol consumption measures be adjusted for gender differences? *Addiction*. 1998; 93: 1137-47.

GUERRI, C.; PASCUAL, M. Mechanisms involved in the neurotoxic, cognitive, and neurobehavioral effects of alcohol consumption during adolescence. *Alcohol*. 2010; 44: 15-26.

GUIDE FOR THE CARE AND USE OF LABORATORY ANIMALS. National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 8^a edição. Washington (DC): National Academies Press (US); 2011.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. *Tratado De Fisiologia Médica* 11. Ed. Rj . Guanabara Koogan; 2006.

HALL, C.S. Emotional behavior in the rat: Defecation and urination as measures of individual differences in the emotionality. *J. Comp. Psychol*. 1934; 18:385-403.

HANDLEY, S. L.; MITHANI, S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of “fear”-motivated behaviour. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol*. 1984; 327:1-5.

HAO, H.N.; PARKER, G.C.; ZHAO, J.; BARAMI, K.; LYMAN, W.D. Human neural stem cells are more sensitive than astrocytes to ethanol exposure. *Alcohol ClinExp Res*. 2003; 27:1310–7.

HAORAH, J.; RAMIREZ, S.H.; FLOREANI, N.; GORANTLA, S.; MORSEY, B.; PERSIDSKY, Y. Mechanismo of alcohol- induce oxidative stress and neuronal injury. *Free Radic Biol Med*. 2008b; 45(11):1542-1550.

HAORAH, J.; SCHALL, K.; RAMIREZ, S.H.; PERSIDSKY, Y. Activation of protein tyrosine kinases and matrix metalloproteinases causes blood-brain barrier injury: Novel mechanism for neurodegeneration associated with alcohol abuse. *Glia*. 2008a; 56: 78-88.

HARDING, A., HALLIDAY, G., NG, J., HARPER, C.; KRIL, J. Loss of vasopressin-immunoreactive neurons in alcoholics is dose-related and time-dependent. *Neuroscience*. 1996; 72: 699–708.

HARDING, A.J.; HALLIDAY, G.M.; HARPER, C.G.; KRIL, J.J. Loss of vasopressin immunoreactive neurons in alcoholics is dose-related and time-dependent. *Neuroscience*. 1996; 72: 699-708.

HARPER, C. Neuropathology of brain damage caused by alcohol. *Med. J. Aust.* 1982; 2: 277–282.

HARPER, C. The neuropathology of alcohol-related brain damage. *Alcohol Alcohol*. 2009; 44: 136–140.

HARPER, C.; MATSUMOTO, I. Ethanol and brain damage. *Current Opinion in Pharmacology*. 2005; 5: 73–78.

HARPER, C.G.; KRIL, J.J.; DALY, J. Are we drinking our neurones away? *Br Med J*. 1987; 294: 534-536.

HE, S.Q.; DUM, R.P. e STRICK, P.L. Topographic organization of CORTicospinal projections from the frontal lobe: motor areas on the lateral surface of the hemisphere. *J. Neurosci*. 1993; 13: 952-980.

HECHT, R., CONNELLY, M., MARCHETTI, L., BALL, W.D.; HAND, A.R. Cell death during development of intercalated ducts in the rat submandibular gland. *Anat. Rec. (Hoboken)*. 2000; 258: 349-358.

HIBELL, B.; ANDERSSON, B.; BJARNASON, T.; AHLSTRÖM, S.; BALAKIREVA, O.; KOKKEVI A.; MORGAN, M. The ESPAD Report 2003: Alcohol and Other Drug Use Among Students in 35 European Countries. The Swedish Council for Information on Alcohol and Other Drugs (CAN), Stockholm; 2004.

HOFFMAN, P.L. IORIO, K.R.; SNELL, L.D.; TABAKOFF, B. Attenuation of glutamate-induced neurotoxicity in chronically ethanol exposed cerebellar granule cells by NMDA receptor antagonists and ganglioside GM1. *Alcohol Clin Exp Res*. 1995; 19: 721–6.

HUGHES, R.N. Neotic preferences in laboratory rodents: issues, assessment and substrates. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 2007; 31: 441–464.

IMAYOSHI, I.; SAKAMOTO, M.; OHTSUKA, T.; TAKAO, K.; MIYAKAWA, T.; YAMAGUCHI, M.; MORI, K.; IKEDA, T.; ITOHARA, S.; KAGEYAMA, R. Roles of continuous neurogenesis in the structural and functional integrity of the adult forebrain. *Nat Neurosci*. 2008; 11: 1153–1161.

INPAD–INSTITUTO NACIONAL DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA PARA POLÍTICAS PÚBLICAS DO ÁLCOOL E OUTRAS DROGAS. II levantamento nacional de álcool e drogas. Disponível em: < www.inpad.org.br/lenad > Acessado em 23 de junho de 2013.

INTERNATIONAL CENTER FOR ALCOHOL POLICIES. ICAP blue book. Practical guides for alcohol policy and prevention approaches. Disponível em: <www.icap.org/Portals/0/download/all_pdfs/blue_book/Module20>. Acesso em : 05 de maio de 2014.

JAATINEN, P.; RINTALA, J. Mechanisms of ethanol-induced degeneration in the developing, mature, and aging cerebellum. *The Cerebellum*. 2008; 332-347.

JACOBUS, J.; TAPERT, S.F. Neurotoxic Effects of Alcohol in Adolescence. *Annu. Rev. Clin. Psychol.* 2013; 9:703–21.

JACOBUS, J.; TAPERT, S.F. Neurotoxic Effects of Alcohol in Adolescence. *Annu. Rev. Clin. Psychol.* 2013; 9:703–21.

JASKOLL, T.; MELNICK, M. Submandibular gland morphogenesis: stage-specific expression of TGF- α /EGF, IGF, TGF- β , TNF, and IL-6 signal transduction in normal embryonic mice and the phenotypic effects of TGF- β 2, TGF- β 3, and EGF-r null mutations. *Anat. Rec. (Hoboken)*. 1999; 256: 252-268.

JOHNSTON, L.D.; O'MALLEY, P.M.; BACHMAN, J.G.; SCHULENBERG, J.E. Monitoring the future national results on adolescent drug use: overview of key findings, 2008. Em: *Abuse*. Bethesda, MD: National Institute on Drug Abuse. NIH Publication; 2009; p. 09.

JONES, B.J.; ROBERT, D.J. The quantitative measurement of motor incoordination in naive mice using an accelerating rotarod. *J Pharm Pharmac.* 1968; 20: 302-304.

JUNE, S. R.H. L.; FOSTER, K.L.; EILER, II W.J.; GOERGEN, J.; COOK, J.B.; JOHNSON. N. Dopamine and benzodiazepine-dependent mechanisms regulate the EtOH-enhanced locomotor stimulation in the GABAA α 1 subunit null mutant mice. *Neuropsychopharmacology*. 2007; 32: 137–152.

JUNG, M.E.; METZGER, D.B. Alcohol withdrawal and brain injuries: beyond classical mechanisms. *Molecules*. 2010; 15: 4984-5011.

KARADAYIAN, A.G.; LORES-ARNAIZ, S.; CUTRERA, R.A. The effect of constant darkness and circadian resynchronization on the recovery of alcohol hangover. *Behavioural Brain Research*. 2014; 268: 94–103.

KARL, T.; PABST, R.; VONHÖRSTEN, S. Behavioral phenotyping of mice in pharmacological and toxicological research. *Exp Toxic Pathol* 2003; 55: 69–83.

KELM, M.K.; CRISWELL, H.E.; BREESE, G.R. Ethanol-enhanced GABA release: a focus on G protein-coupled receptors. *Brain Res. Rev.* 2011; 65: 113-123.

KEMPERMANN, G.; SONG, H.; GAGE, F.H. Neurogenesis in the hippocampus. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2015; 7(9): 1-12.

KEMPERMANN, G.; WISKOTT, L.; GAGE, F.H. Functional significance of adult neurogenesis. *Curr Opin Neurobiol.* 2004; 14: 186–191.

KULKARNY, V.V. WIEST, N.E.; MARQUEZ, C.P.; NIXON, S.C.; VALENZUELA, C.F.; PERRONE-BIZZOZERO, N.I. Opposite effects of acute ethanol exposure on GAP-43 and BDNF expression in the hippocampus versus the cerebellum of juvenile rats. *Alcohol*. 2011; 45(5): 461-471.

KUMAR, S.; FLEMING, R.L.; MORROW, A.L. Ethanol regulation of γ -aminobutyric acid A receptors: genomic and nongenomic mechanisms. *Pharmacol Ther*. 2004; 101: 211–226.

KURATA, K. Information processing for motor control in primate premotor CORTEX. *Behav. Brain Res*. 1994; 61: 135-142.

KUZMIN, A.; LILJEQUIST, S.; MEIS, J.; CHEFER, V.; SHIPPENBERG, T.; BAKALKIN, G. Repeated moderate-dose ethanol bouts impair cognitive function in Wistar rats. *Addict Biol*. 2012; 17(1): 132–140.

LALONDE, R.; STRAZIELLE, C. Sensorimotor learning in *Dab1*(scm) (scrambler) mutant mice. *Behav Brain Res*. 2011; 218:350-2.

LAUING, K.; HIMES, R.; RACHWALSKI, M.; STROTMAN, P.; CALLACI, J.J. Binge alcohol treatment of adolescent rats followed by alcohol abstinence is associated with site-specific differences in bone loss and incomplete recovery of bone mass and strength. *Alcohol*. 2008; 42: 649-656.

LINDTNER, C.; SCHERER, T.; ZIELINSKI, E.; FILATOVA, N.; FASSHAUER, M.; TONKS, N.K.; PUCHOWICZ, M.; BUETTNER, C. Binge Drinking Induces Whole-Body Insulin Resistance by Impairing Hypothalamic Insulin Action. *Sci Transl Med*. 2013; 5: 170ra14. doi:10.1126/scitranslmed.3005123.

LISTER, R. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology*. 1987; 92:180-185.

LITTLE, P.J.; KUHN, C.M.; WILSON, W.A.; SWARTZWELDER, H.S. differential effects of ethanol in adolescent and adult rats. *Alcohol Clin Exp Res*. 1996; 20(8): 1346-51.

LIU, J.; WU, D.C.; WANG, Y.T. Allosteric potentiation of glycine receptor chloride currents by glutamate. *Nature Neuroscience*. 2010; 13: 1225–1232.

LIU, S.; SHI, W.; LI, G.; JIN, B.; CHEN, Y.; HU, H.; LIU, L.; XIE, F.; CHEN, K.; YIN, D. Plasma reactive carbonyl species levels and risk of non-alcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol Hepatol*. 2011; 26(6): 1010-5.

LIVY, D.J.; PARNELL, S.E.; WEST J. R. Blood ethanol concentration profiles: a comparison between rats and mice. *Alcohol*. 2003; 29: 165–171.

LOBO, I.A.; HARRIS, R.A. GABA(A) receptors and alcohol. *Pharmacol Biochem Behav*. 2008; 90: 90-94.

LOGRIP, M.L.; RIVIER, C.; LAU, C.; IM, S.; VAUGHAN, J.; LEE, S. Adolescent alcohol exposure alters the rat adult hypothalamic–pituitary–adrenal axis responsiveness in a sex-specific manner. *Neuroscience*. 2013; 235: 174–186.

LOVINGER, D.M. 5-HT₃ receptors and the neural actions of alcohols: an increasingly exciting topic. *Neurochem Int*. 1999; 35: 125 –130.

MAIA, C.S.F.; FERREIRA, V.M.M.; DINIZ, J.S.V.; CARNEIRO, F.P.; DE SOUSA, J.B.; DA COSTA, E.T.; TOMAZ, C. Inhibitory avoidance acquisition in adult rats exposed to a combination of ethanol and methylmercury during central nervous system development. *Behavioural Brain Research*. 2010; 211: 191 - 197.

MAIER, H., BORN, I.A., VEITH, S., ADLER, D.; SEITZ, H.K. The effect of chronic ethanol consumption on salivary gland morphology and function in the rat. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 1986; 10: 425-427.

MAIER, H., SEITZ, H.K., MAYER, B., ADLER, D., MALL, G.; BORN, I.A. Lipomatous atrophy of the parotid gland in chronic alcohol consumption. *Laryngorhinootologie*. 1990: 69: 600-604.

MAIER, S.E.; WEST, J.R. Regional differences in cell loss associated with binge-like alcohol exposure during the first two trimesters equivalent in the rat. *Alcohol*. 2001; 23: 49-57.

MANDEL, L., VAKKAS, J.; SAQI, A. Alcoholic (Beer) sialosis. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 2005; 63: 402-405.

MANDEL, L.; BAURMASH, H. Parotid enlargement due to alcoholism. *J. Am. Dent. Assoc.* 1971; 82: 369-373.

MANDIY, L.; SURAFFANON, F. Bilateral parotid swelling: a review. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* 2002; 93: 221-237.

MANZO-AVALOS, S.; SAAVEDRA-MOLINA, A. Cellular and Mitochondrial Effects of Alcohol Consumption. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 2010; 7: 4281 – 4304.

MARRONI, S.S.; NAKANO, F.N.; GATI, C.D.C.; OLIVEIRA, J.A.C.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; GARCIA-CAIRASCO, N. Neuroanatomical and cellular substrates of hypergrooming induced by microinjection of oxytocin in central nucleus of amygdala, an experimental model of compulsive behavior. *Molecular Psychiatry*. 2007; 12: 1103–1117.

MARTIN, G.L.; BRIERA, F.A.; CALVO, P. Effects of chronic ethanol treatment and ethanol withdrawal on [3H]SCH23390 binding to rat striatal membranes *Neuropharmacol.* 1997; 36: 101-106.

MARTZ, A.; DEITRICH, R. A.; & HARRIS, R. A. Behavioral evidence for the involvement of g-aminobutyric acid in the actions of ethanol. *Eur J Pharmacol.* 1983; 89: 53 – 62.

MATHURIN, P.; DELTENRE, P. Effect of binge drinking on the liver: an alarming public health issue? *Gut*. 2009; 58: 613–617.

MATSUURA, K.; KABUTO, H.; MAKINO, H.; OGAWA, N. Pole test is a useful method for evaluating the mouse movement disorder caused by striatal dopamine depletion. *J Neurosci Methods*. 1997; 73:45–8.

MATSUURA, K.; KABUTO, H.; MAKINO, H.; OGAWA, N. Pole test is a useful method for evaluating the mouse movement disorder caused by striatal dopamine depletion. *J Neurosci Methods*. 1997; 73: 45 – 8.

MATSUWAKI, T.; YAMANOUCHI, K.; NISHIHARA, M. The effect of glucocorticoids on bradykinesia induced by immobilization stress. *Hormones and Behavior*. 2008; 54: 41–46.

MATSUWAKI, T.; YAMANOUCHI, K.; NISHIHARA, M. The effect of glucoCORTicoids on bradykinesia induced by immobilization stress. *Hormones and Behavior*. 2008; 54: 41–46.

MCCLAIN, J.A.; MORRIS, S.A.; MARSHALL, S.A.; NIXON, K. Ectopic hippocampal neurogenesis in adolescent male rats following alcohol dependence. *Addiction Biology*. 2013; 19: 687–699.

MCDERMOTT, J.L.; KREUTZBERG, J.D.; Liu, B.; DLUZEN, D.E. Effects of estrogen treatment on sensorimotor task performance and brain dopamine concentrations in gonadectomized male and female CD-1 mice. *Horm Behav*. 1994; 28: 16–28.

MELONI, J.N.; LARANJEIRA, R. Custo Social e de Saúde do Consumo do Álcool. *Revista Brasileira Psiquiátrica*. 2004; 26: 7 – 10.

MICHEL, M., TÖRÖK, N., GODBOUT, M.J., LUSSIER, M.; GAUDREAU, P., ROYAL, A.; GERMAIN, L. Keratin 19 as a biochemical marker of skin stem cells in vivo and in vitro: keratin 19 expressing cells are differentially localized in function of anatomic sites, and their number varies with donor age and culture stage. *J. Cell Sci*. 1996; 109: 1017-28.

MIDDLETON, F.A.; STRICK, P.L. Basal-ganglia ‘projections’ to the pré-frontal córtex of the primate. *Cereb CORTex*. 2002; 12: 926-935.

MILLER, M. W. Effect of prenatal exposure to ethanol on glutamate and gaba immunoreactivity in macaque somatosensory and motor CORTices: critical timing of exposure. *Neuroscience*. 2006; 138: 97–107.

MÖYKKYNNEN, T.; KORPI, E. R. Acute Effects of Ethanol on Glutamate Receptors. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*. 2012; 111: 4–13.

MUKHERJEE, R.A.; HOLLINS, S.; TURK, J. Fetal alcohol spectrum disorder: an overview. *Jr Soc Med*. 2006, 99(6): 298-302.

MULHOLLAND, P. J.; HOPF, F. W.; BUKIYA, A. N.; MARTIN, G. E.; LIU, J.; DOPICO, A. M. Sizing up ethanol-induced plasticity: the role of small and large conductance calcium-activated potassium channels. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 2009; 33: 1125 – 1135.

NADEL, L. The hippocampus and space revisited. *Hippocampus*. 1991; 1: 221-229.

NAHAS, T.R. O teste do Campo Aberto. Departamento de Fisiologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo; 2001.

NAIR, D.G.; PURCOTT, K.L.; FUCHS, A.; STEINBERG, F.; KELSO, J.A. Cortical and cerebellar activity of the human brain during imagined and executed unimanual and bimanual action sequences: a functional MRI study. *Cogn Brain Res.* 2003; 15: 250-260.

NARAHASHI, T.; AISTRUP, G.L.; MARSZALEC, W.; NAGATA, K. Neuronal nicotinic acetylcholine receptors: a new target site of ethanol. *Neurochem Int.* 1999; 35: 131–141.

NATIONAL INSTITUTE ON ALCOHOL ABUSE AND ALCOHOLISM (NIAAA) 2004. National Institute of Alcohol Abuse and Alcoholism Council approves definition of binge drinking. Disponível em: <<http://pubs.niaaa.nih.gov/publications>> . Acesso em: 18 de fevereiro de 2016.

NATIONAL INSTITUTE ON ALCOHOL ABUSE AND ALCOHOLISM (NIAAA). Overview of Alcohol Consumption - Drinking Levels Defined 2016. Disponível em:<<http://www.niaaa.nih.gov/alcoholhealth/overviewalcoholconsumption/moderatebingedriking>> . Acesso em: 15 de setembro 2016.

NEWES-ADEYI, G.; CHEN, C.M.; WILLIAMS, G.D.; FADER, V.B. Surveillance report 74: trends in underage drinking in the United States 1991–2003. NIAAA, Division of Epidemiology and Prevention Research, Alcohol Epidemiologic Data System, Rockville, MD; 2005.

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

NÖR, F., HARTMANN, M.D., SLOGO, P.R., LAMERS, R.L. FOSSATI, A.C. Chronic alcohol consumption promotes alterations on salivary gland regeneration process. *Microsc. Res. Tech.* 2013; 76: 1125- 1130.

NOVELLI, A.; REILLY, J.A.; LYSKO, P.G.; HENNEBERRY, R.C. Glutamate becomes neurotoxic via the N-methyl-D-aspartate receptor when intracellular energy levels are reduced. *Brain.* 1988; 451: 205–12.

OGAWA, N.; HIROSE, Y.; OHARA, S.; ONO, T.; WATANABE, Y. A simple quantitative bradykinesia test in MPTP-treated mice. *J Neural Transm.* 2005; 112: 613-631.

OGAWA, N.; HIROSE, Y.; OHARA, S.; ONO, T.; WATANABE, Y. A simple quantitative bradykinesia test in MPTP-treated mice. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 1985; 50: 435 – 441.

OLEAS, J.; YOKOI, F.; DE ANDRADE, M.P.; PISANI, A.; LI, Y. Engineering animal models of dystonia. *Movement Disorders.* 2013; 28: 990-1000.

OLIVEIRA, A.C.; PEREIRA, M.C.; SANTANA, L.N.S.; FERNANDES, R.M.; TEIXEIRA, F.B.; OLIVEIRA, G.B.; FERNANDES, L.M.P.; FONTES-JÚNIOR, E.A.; PREDIGER, R.D.; CRESPO-LÓPEZ, M.E.; GOMES-LEAL, W.; LIMA, R.R.; MAIA, C.S.F. Chronic ethanol exposure during adolescence through early adulthood in female rats induces emotional and memory deficits associated with morphological and molecular alterations in hippocampus. *Journal of Psychopharmacology*. 2015; 29(6): 712–724.

OLIVEIRA, G.B.; FONTES JR, E.A.; CARVALHO, S.; SILVA, J.B.; FERNANDES, L.M.P.; OLIVEIRA, M.C.S.P.; PREDIGER, R.D.; GOMES-LEAL, W.; LIMA, R.R.; MAIA, C.S.F. Minocycline mitigates motor impairments and CORTical neuronal loss induced by focal ischemia In rats chronically exposed to ethanol during adolescence. 2014; 1561: 23-34.

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

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

ORTELLS, M.O.; LUNT, G.G.. Evolutionary history of the ligand-gated ion-channel superfamily of receptors. *Trends Neurosci*. 1995; 18: 121–127.

OSTOJIĆ, J. N; MLADENović, D.; NINKović, M.; VUČEVIĆ, D.; BONDŽIĆ, K.; JEŠIĆ-VUKIĆEVIĆ, R.; RADOSAVLJEVIĆ, T. The effects of cold-induced stress on liver oxidative injury during binge drinking. *Human & experimental toxicology*. 2012; 4: 387– 96.

OSTROWSKA, J.; ŁUCZAJ, W.; KASACKA, I.; ROZANASKI, A.; SKRZYDLEWSKA, E. Green tea protects against ethanol-induced lipid peroxidation in rat organs. *Alcohol*. 2004; 32: 25–32.

PANDOLFO P.; PAMPLONA F.A.; PREDIGER, R.D.S.; TAKAHASHI, R.N. Increased sensitivity of adolescent spontaneously hypertensive rats, an animal model of attention deficit hyperactivity disorder, to the locomotor stimulation induced by the cannabinoid receptor agonist WIN 55, 212-2. *European Journal of Pharmacology*. 2007; 563: 141–148.

PARADA, M.; CORRAL, M.; CAAMAÑO-ISORNA, F.; MOTA, N.; CREGO, A.; HOLGUÍN, S.R.; CADAVEIRA, F. Definición del concepto de consumo intensivo de alcohol adolescente (binge drinking). *Adicciones*. 2011; 23: 53-63.

PASCUAL, M.; BALIÑO, P.; ALFONSO-LOECHES, S.; ARAGÓN, C.M.G.; GUERRI, C. Impact of TLR4 on behavioral and cognitive dysfunctions associated with alcohol-induced neuroinflammatory damage. *Brain, Behavior, and Immunity*. 2011; 25: 80–91.

PASCUAL, M.; BLANCO, A. M.; CAULI, O.; MIÑARRO, J.; & GUERRI, C. Intermittent ethanol exposure induces inflammatory brain damage and causes long-term behavioural alterations in adolescent rats. *European Journal of Neuroscience*. 2007; 25: 541-550.

- PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S.E.; BRILEY, M. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods*. 1985; 14:149-67.
- PERRY, T.A.; TORRES, E.M.; CZECH, C.; BEYREUTHER, K.; RICHARDS, S.; DUNNETT, S.B. Cognitive and motor function in transgenic mice carrying excess copies of the 695 and 751 amino acid isoforms of the amyloid precursor protein gene. *Alzheimer's Res*. 1995; 1: 5 – 14.
- PETIT, G.; KORNREICH, C.; VERBANCK, P.; CAMPANELLA, S. Gender differences in reactivity to alcohol cues in binge drinkers: A preliminary assessment of event-related potentials. *Psychiatry Research*. 2013; 209: 494-503.
- PINSKY, I.; SANCHES, M.; ZALESKI, M.; LARANJEIRA, R.; CAETANO, R.; Patterns of alcohol use among Brazilian adolescents. *Rev. Bras. Psiquiatr*. 2010; 32: 231–241.
- PIRES, V.A.; PAMPLONA, F.A.; PANDOLFO, P.; FERNANDES, D.; PREDIGER, R.D.; TAKAHASHI, R.N. Adenosine receptor antagonists improve short-term object-recognition ability of spontaneously hypertensive rats: a rodent model of attention-deficit hyperactivity disorder. *Behav Pharmacol*. 2009; 20:134-45.
- POMBO, S.; DA COSTA, N.F.; FIGUEIRA, M.L.; ISMAIL, F.; LESCH, O.M. Multidimensional alcoholism typologies: could they guide clinical practice? Results from a 3-monthprospective study. *Int J Psychiatry Clin Pract*. 2015;19:137-47
- QUINN, R. Comparing rat's to human's age: how old is my rat in people years? *Nutrition*. 2005; 21(6):775-7.
- RAJGOPAL, Y.; CHETTY, C.S.; VEMURI, M.C. Differential modulation of apoptosis-associated proteins by ethanol in rat cerebral CORTex and cerebellum. *Eur J Pharmacol*. 2003; 470: 117–124.
- REHM, J.; MATHERS, C.; POPOVA, S.; THAVORNCHAROENSAP, M.; TEERAWATTANANON, Y.; PATRA, J. Global burden of disease and injury and economic cost attributable to alcohol use and alcohol-use disorders. *Lancet*. 2009; 373: 2223-2233.
- RIEDEL, F., GOESSLER, U.; HÖRMANN, K. Alcohol-related diseases of the mouth and throat. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol*. 2003; 17: 543-555.
- ROMANO, M.; DUAILIBI, S.; PINSKY, I.; LARANJEIRA, R. Alcohol purchase survey by adolescents in two cities of State of Sao Paulo, Southeastern Brazil. *Rev. Saude Publ*. 2007; 41: 495–501.
- ROMEO, R.D. Adolescence: a central event in shaping stress reactivity. *Dev Psychobiol*. 2010; 52:244–253.
- Sampson, H. W., Gallager, S., Lange, J., Chondra, W., and Hogan, H. A. Binge drinking and bone metabolism in a young actively growing rat model. *Alcohol. Clin. Exp. Res*. 1999; 23: 1228–1231.

SANCHEZ, Z.M.; MARTINS, S.S.; OPALEYE, E.S.; MOURA, Y.G.; LOCATELLI, D.P.; NOTO, A.R. Social factors associated to binge drinking: a cross-sectional survey among Brazilian students in private high schools. *BMC Public Health*. 2011; 11:201.

SANDERSON, J.L.; DONALD PARTRIDGE, L.; FERNANDO VALENZUELA, C. Modulation of GABAergic and glutamatergic transmission by ethanol in the developing neoCORTex: An in vitro test of the excessive inhibition hypothesis of fetal alcohol spectrum disorder. *Neuropharmacology*. 2009; 56: 541-555.

SCHARFMAN, H.; GOODMAN, J.; MACLEOD, A.; PHANI, S.; ANTONELLI, C. CROLL, S. Increased neurogenesis and the ectopic granule cells after intrahippocampal BDNF infusion in adult rats. *Exp neurol*. 2005: 192(2): 348-56.

SCHUCKIT, M.A. Alcohol-use disorders. *Lancet*. 2009; 373: 492-501.

SCHULTEIS, G.; LIU, J. Brain reward deficits accompany withdrawal (hangover) from acute ethanol in rats. *Alcohol*. 2006: 39: 21-28.

SCOTT, J., BURNS, J.; FLOWER, E. Histological analysis of parotid and submandibular glands in chronic alcohol abuse: a necropsy study. *J. Clin. Pathol*. 1988: 41: 837-840.

SCOTT, J., BURNS, J.; FLOWER, E. Histological analysis of parotid and submandibular glands in chronic alcohol abuse: a necropsy study. *J. Clin. Pathol*. 1988: 41: 837-840.

SELEMON LD. A role for synaptic plasticity in the adolescent development of executive function. *Translational Psychiatry*. 2013, 3:238.

SEMPLE, B.D.; BLOMGREN, K.; GIMLIN, K.; FERRIERO, D.M.; NOBLE-HAEUSSLEIN, L.J. Brain development in rodents in humans: identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. *Progress in neurobiology*. 2013: 106-107: 1-16.

SIGGINS, G.R.; ROBERTO, M.; NIE, Z. The tipsy terminal: presynaptic effects of ethanol. *Pharmacol Ther*. 2005; 107: 80–98.

SILBERMAN, Y.; BAJO, M.; CHAPELL, A.M.; CHRISTIAN, D.T.; CRUZ, M.; DIAZ, M.R.; KASH, T.; LACK, A.K.; MESSING, R.O.; SIGGINS, G.R.; WINDER, D.; ROBERTO, M.; McCool, B.A.; WEINER, J.L. Neurobiological mechanisms contributing to alcohol-stress-anxiety interactions. *Alcohol*. 2009: 43(7): 509-19.

SKALA, K.; WALTER, H. Adolescence and Alcohol: a review of the literature. *Neuropsychiatrie*. 2013; 27:202-211.

SLAMBEROVÁ, R.; POMETLOVÁ, M.; CHAROUSOVÁ, P. Postnatal development of rat pups is altered by prenatal methamphetamine exposure. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 2006; 30: 82 – 88.

SPANAGEL, R.; SIGMUND, S.; COWEN, M.; SCHROFF, K.C.; SCHUMANN, G.; FISEROVA M, E.T. The neuronal nitric oxide synthase (nNOS) gene is critically involved in neurobehavioral effects of alcohol. *J Neurosci*. 2002; 22: 8676–8683.

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

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

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

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

SPRUIJT, B.M.; VAN HOOFF, J.A.; GISPEN, W.H. Ethology and neurobiology of grooming behavior. *Physiol Rev.* 1992; 72: 825-52.

STANLEY, J.L.; LINCOLN, R.J.; BROWN, T.A.; MCDONALD, L.M.; DAWSON, G.R.; REYNOLDS, D.S. The mouse beam walking assay offers improved sensitivity over the mouse rotarod in determining motor coordination deficits induced by benzodiazepines. *J Psychopharmacol.* 2005; 19: 221-227.

STANSFIELD, K.H.; KIRSTEIN, C.L. Chronic cocaine or ethanol exposure during adolescence alters novelty-related behaviors in adulthood. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior.* 2007: 86: 637–642.

STANSFIELD, K.H.; KIRSTEIN, C.L. Effects of Novelty on Behavior in the Adolescent and Adult Rat. *Novelty and Adolescence.* 2005.

SULLIVAN, E.V.; PFEFFERBAUM, A. Neurocircuitry in alcoholism: a substrate of disruption and repair. *Psychopharmacology.* 2005; 180:583-594.

SULLIVAN, E.V.; ROSENBLOOM, M.J.; LIM, K.O.; PFEFFERBAUM, A. Longitudinal changes in cognition, gait, and balance in abstinent and relapsed alcoholic men: relationships to changes in brain structure. *Neuropsychology.* 2000; 14:178–88.

TAKAHASHI, S., SHINZATO, K., NAKAMURA, S., DOMON, T., YAMAMOTO, T., WAKITA, M. Cell death and cell proliferation in the regeneration of atrophied rat submandibular glands after duct ligation. *J. Oral Pathol. Med.* 2004: 33: 23-29.

TAKAHASHI, T.T.; VENDRUSCOLO, L.F.; TAKAHASHI, R.N. Binge-like ingestion of a combination of an energy drink and alcohol leads to cognitive deficits and motivational changes. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior.* 2015: 136: 82–86.

TAPERT, S.F.; BROWN, G.G.; BARATTA, M.V.; BROWN, S.A. fMRI BOLD response to alcohol stimuli in alcohol dependent young women. *Addict. Behav.* 2004: 29(1):33–50.

TATENO, M.; UKAI, W.; YAMAMOTO, M.; HASHIMOTO, E.; IKEDA, H.; SAITO, T. The effect of ethanol on cell fate determination of neural stem cells. *Alcohol ClinExp Res.* 2005; 29: 225–229.

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

TIEMEIER, H.; LENROOT, R.K.; GREENSTEIN, D.K.; TRAN, L.; PIERSON, R.; GIEDD, J.N. Cerebellum development during childhood and adolescence: A longitudinal morphometric MRI study. *NeuroImage*. 2010; 49: 63–70.

TIRELLIA, E.; LAVIOLA, G.; ADRIANI, W. Ontogenesis of behavioral sensitization and conditioned place preference induced by psychostimulants in laboratory rodents. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 2003; 27: 163–178.

TREISTMAN, S. N.; MARTIN, G. E. BK Channels: mediators and models for alcohol tolerance. *Trends in Neurosciences*. 2009; 32: 629 – 637.

TREIT, D.; MENARD, J.; ROYAN, C. Anxiogenic Stimuli in the Elevated Plus-Maze. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 1993; 44: 463-469.

TYLER, W. J.; ALONSO, M.; BRAMHAM, C. R.; POZZO-MILLER, L. D. From acquisition to consolidation: on the role of brain-derived neurotrophic factor signaling in hippocampal-dependent learning. *Learn. Mem.* 2002; 9: 224–237.

UHART, M.; WAND, G.S. Alcohol and drug interaction: an update of human research. *Addict Biol.* 2009; 14: 43-64.

UHART, M.; WAND, G.S. Stress, alcohol and drug interaction: an update of human research. *Addict Biol.* 2009; 14: 43-64.

VAN SKIKE, C.E.; BOTTA, P.; CHIN, V.S.; TOKUNAGA, S.; MCDANIEL, J.J.; VENARD, J.; DIAZ-GRANADOS, J.L.; VALENZUELA, C.F.; MATTHEWS, D.B. Behavioral effects of ethanol in cerebellum are age dependent: potential system and molecular mechanisms. *Alcohol Clin Exp Res*. 2010; 34: 2070-2080.

VAN-SKIKE, C.E.; DIAZ-GRANADOS, J.L.; MATTHEWS, D.B. Chronic Intermittent Ethanol Exposure Produces Persistent Anxiety in Adolescent and Adult Rats. *Alcoholism: clinical and experimental research*. 2015; 39: 262-271.

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

VASCONCELOS, S.M.L.; GOULART, M.O.F.; MOURA, J.B.F.; MANFREDI, V.; BENFATO, M.S.; KUBOTA, L.T. Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humana: principais métodos analíticos para sua determinação. *Química Nova*. 2007; 30(5): 1323-1338.

VENGELIENE, V.; BILBAO, A.; MOLANDER, A.; SPANAGEL, R. Neuropharmacology of alcohol addiction. *Br J Pharmacol.* 2008;154 :299-315.

VENGELINE, V.; BILBAO, A.; MOLANDER, A.; SPANAGEL, R. Neuropharmacology of alcohol addiction. *Br. J. Pharmacol.* 2008; 154: 299-315.

VETRENO, R.P.; CREWS, F. Binge ethanol exposure during adolescence leads to a persistent loss of neurogenesis in the dorsal and ventral hippocampus that is associated with impaired adult cognitive functioning. *Frontiers in Neuroscience.* 2015; 9: 1-12.

VETRENO, R.P.; CREWS, F.T. Adolescent binge drinking increases expression of the danger signal receptor agonist HMGB1 and Toll-like receptors in the adult prefrontal cortex. *Neuroscience.* 2012; 226: 475–88.

VONGHIA, L.; LEGGIO, L.; FERRULLI, A.; BERTINI, M.; GASBARRINI, G.; ADDOLORATO, G. Acute alcohol intoxication. *Eur. J. Intern. Med.* 2008; 19(8): 561-567.

WADLEIGHT, A.; VALENZUELA, C.F. Ethanol increases GABAergic transmission and excitability in cerebellar molecular layer interneurons from GAD67-GFP knock-in mice. *Alcohol Alcohol.* 2012; 47: 1-8.

WALKER, B.M.; EHLERS, C.L. Age-related differences in the blood alcohol levels of Wistar rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 2009; 91(4): 560-5.

WALKER, N.I.; GOBÉ, G.C. Cell death and cell proliferation during atrophy of the rat parotid gland induced by duct obstruction. *J. Pathol.* 1987; 153: 333-344.

Walsh, R. N., Cummins, R. A. 1976. The open-field test: a critical review. *Psychological Bulletin*, 83, 482-504.

WARD, R.J.; COLIVICCHI, M.A.; ALLEN, R.; SCHOL, F.; LALLEMAND, F.; WITTE, P.; BALLINI, C, CORTE, L.D.; DEXTER, D. Neuro-inflammation induce in the hippocampus of “binge drinking” rats may be mediated by elevated extracellular glutamate content. *J Neurochemistry.* 2009; 111: 1119-1128.

WECHSLER, H.; DOWDALL, G.W.; DAVENPORT, A.; CASTILLO, S. Correlates of college student binge drinking. *Am J Public Health.* 1995; 85: 921–926.

WEICHSELBAUM, T. E. An accurate and rapid method for the determination of proteins in small amounts of blood serum and plasma. *American journal of clinical pathology.* 1946; 10: 40–9.

WEINER, J. L.; & VALENZUELA, C. F. Ethanol modulation of GABAergic transmission: the view from the slice. *Pharmacology & Therapeutics.* 2006; 111: 533–554.

WHISHAW, I.Q.; HAUN, F.; KOLB, B. *Analysis of Behavior in Laboratory Rodents.* Springer. 1999; 44: 1243-1275.

WHITE, A. M.; TRUESDALE, M. C.; BAE, J. G.; AHMAD, S.; WILSON, W. A.; BEST, P. J.; SWARTZWELDER, H. S. Differential effects of ethanol on motor coordination in adolescent and adult rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2002; 73: 673–677.

WHITE, A. Many college freshmen drink at levels far beyond the binge threshold. *Alcohol ClinExp Res.* 2006; 30: 1006–1010.

WILLEY, A.R.; ANDERSON, R.I.; MORALES, M.; RAMIREZ, R.L.; SPEAR, L.P. Effects of ethanol administration on corticosterone levels in adolescent and adult rats. *Alcohol.* 2012; 46: 29-36.

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

ZAKHARI, S. Overview: how is alcohol metabolized by the body? *Alcohol research & health: the journal of the National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism.* 2006; 29: 245-254.

ZEIGLER, D.W.; WANG, C.C.; YOAST, R.A.; DICKINSON, B.D.; MCCAFFREE, M.A.; ROBINOWITZ, C.B.; STERLING, M.L. The neurocognitive effects of alcohol on adolescents and college students. *Prev Med.* 2005; 40: 23-32.

ZERNIG, G.; SARIA, A.; KURZ, M.; O'MALLEY, S. *Handbuch Alkoholismus.* Editora: Verlag der Universitätsklinik für Psychiatrie; 2000.

ZHANG, Z.; MORSE, A.C.; KOOB, G.F.; SCHULTEIS, G. Dose- and time-dependent expression of anxiety-like behavior in the elevated plus-maze during withdrawal from acute and repeated intermittent ethanol intoxication in rats. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research.* 2007; 31: 1811–1819.

ZHAO, Y.N.; WANG, F.; FAN, Y.X.; PING, G.F.; YANG, J.Y.; WU, C.F. Activated microglia are implicated in cognitive deficits, neuronal death, and successful recovery following intermittent ethanol exposure. *Behavioural Brain Research.* 2013; 236: 270– 282.

ZHENG, Y.; CHEUNGA, I.; SMITHA, P.F. Performance in anxiety and spatial memory tests following bilateral vestibular loss in the rat and effects of anxiolytic and anxiogenic drugs. *Behavioural Brain Research.* 2012; 235: 21– 29.

ZHONG, B., STRNAD, P., TOIVOLA, D.M., TAO, G.Z., JI, X., GREENBERG, H.B.; OMARY, M.B. Reg-II is an exocrine pancreas injury-response product that is up-regulated by keratin absence or mutation. *Mol. Biol. Cell.* 2007; 18: 4969-4978.

ZOU, J.Y.; CREWS, F.T. TNF alpha potentiates glutamate neurotoxicity by inhibiting glutamate uptake in organotypic brain slice cultures: neuroprotection by nf kappa b inhibition. *Brain Res.* 2005; 1034: 11–24.

X ANEXO

ANEXO A – Artigo científico publicado

Histol Histopathol (2015) 30: 1069-1078

<http://www.hh.um.es>**Histology and
Histopathology***Cellular and Molecular Biology***Immunohistochemical changes and atrophy after
chronic ethanol intoxication in rat salivary glands**Luanna Melo Pereira Fernandes¹, Francisco Bruno Teixeira², Sergio Melo Alves Junior²,
João de Jesus Viana Pinheiro², Cristiane Socorro Ferraz Maia³ and Rafael Rodrigues Lima¹¹Laboratory of Functional and Structural Biology, Institute of Biological Sciences, ²School of Dentistry and ³Laboratory of Pharmacology of Inflammation and Behaviour, Faculty of Pharmacy, Institute of Health Science, Federal University of Pará, Campus Guamá, Belém, Pará, Brazil

Summary. Alcoholism in humans is a chronic and progressive disease, characterized by loss of ethanol consumption control. Previous studies have reported that prolonged exposure to ethanol was responsible for alterations in glandular tissues of human and rodents. However, the interrelationship between ethanol and the glandular system is still the subject of numerous investigations, including the possible resistance of the submandibular gland (SG). In the present study, we investigated whether chronic ethanol exposure during adolescence may affect the parotid gland (PG) and SG in female rats. Female rats (n=16) were treated with distilled water or ethanol (dose of 6.5 g/kg/day, 22.5% w/v) through gavage for 55 days. Glands were collected, weighed and submitted to histological processing. Morphometric analysis was assessed by parenchymal and stromal area measurements. Smooth muscle actin (α -SMA), cytokeratin-19 (CK19) and apoptotic caspase-3 (CAS) were measured using ImageJ[®] software. Chronic ethanol administration did not alter the body weight of rats after treatment, although it increased glandular weight (p<0.001), reduced the parenchyma area (p<0.001) and decreased CK19 and α -SMA immunostaining in the PG. Besides, ethanol induced CK19 and CAS overexpression, and the occurrence of duct-like structures in SG. These results suggest that

ethanol induces histological and morphometric changes in salivary glands of female rats intoxicated with ethanol during adolescence. Furthermore, the mechanism underlying these alterations needs to be investigated but may be not related to the inflammatory process.

Key words: Ehanol, Salivary glands, Immunohistochemistry, Adolescence

Introduction

Alcoholism is a chronic and progressive psychiatric disorder characterized by the loss of control of ethanol consumption (Friedlander et al., 2003). The World Health Organization (WHO) estimates that ethanol abuse is responsible for approximately 3 million premature deaths worldwide each year and approximately 4% of global morbidity (Schuckit, 2009). The use of the drug has increased in a heavy binge-drinking way (higher doses and longer period of time), among younger women, highlighting the vulnerability of this group and emerging as a public health emergency (Schuckit, 2009; INPAD, 2013).

The effects of chronic ethanol abuse are associated to damage in the tissues and organs in humans and animals, as a result of morphological and functional changes (Molina et al., 2002; Owczarek et al., 2005). Studies have pointed to several organs and systems affected by chronic alcohol exposure in rodents, such as upper digestive tract (Masces et al., 1984; Bagyánszki et al., 2010); liver, lungs, heart, and skeletal muscle (Molina et al., 2002; Owczarek et al., 2005); central

Offprint requests to: Cristiane do Socorro Ferraz Maia, PhD, Laboratory of Pharmacology of Inflammation and Behaviour, Institute of Health Sciences, Federal University of Pará, Street Augusto Corrêa N. 1, Campus do Guamá, Belém-Pará 66075-900, Brazil. e-mail: crismaia@ufpa.br, crismaia0301@hotmail.com
DOI: 10.14670/HH-11-604

nervous system (Oliveira et al., 2014; Teixeira et al., 2014); pancreas (Orabi et al., 2011); and salivary glands (Maier et al., 1986, 1988a,b; Banderas et al., 1992; Carrard et al., 2007; Nör et al., 2013). Studies in humans revealed damage to liver, lungs, heart, skeletal muscle and salivary glands (Scott et al., 1987, 1988; Ferraris et al., 1995, 1999; Bohl et al., 2008). The latter was one of the first structures affected by chronic ethanol consumption (Mandel and Baumash, 1971).

Parotid (PG) and submandibular (SG) glands are classified as major salivary glands, and both are microscopically similar in architecture. The glandular parenchyma consists of continuous-secreting acini cells, which leads to a system of ducts that empty into the oral cavity (Actis et al., 2002). In rodents, the PG is located behind and below the ear, caudally bordering the SG. Microscopically, the PG consists of pure serous acini. On the other side, SG is a mixed gland that includes both serous and mucous acini (Amano et al., 2012). Both these glands contribute to 95% of the total salivary secretion produced and secreted into oral cavity, which the SG contributes 60-70% (Faustino and Stipp, 2003; Katchburian and Arana, 2004).

Ethanol rapidly diffuses into saliva and oral tissues (Gifford et al., 2008). Immediately after alcohol exposure, high concentrations of this drug are detected in the salivary glands (Waszkiewicz et al., 2013b). Thus, chronic alcohol exposure may promote effects on saliva, including a reduction in the salivary flow rate associated to gland atrophy, and reduced electrolytes, salivary proteins and glycoproteins (e.g. amylase, immunoglobulin A, lysozyme, lactoferrin) which modifies the morphology and physiology of the salivary glands (Lieber, 1991; Faustino and Stipp, 2003; Riedel et al., 2003; Waszkiewicz et al., 2013a,b).

However, there are insufficient studies in the literature in order to clarify these structural alterations, as well as in the morphometry and in the structure of its cellular components. Thus, our protocol aims to investigate the morphometric and immunohistochemical changes of the PG and SG in female rats exposed to heavy alcohol exposure during adolescence.

Materials and methods

Animals

A total of 16 adolescent female Wistar rats, 35 days old at the beginning of the experiments (50-60 g) were obtained from the Federal University of Pará (UFPA) and kept in collective cages (a maximum of five animals per cage). Animals were maintained in a climate-controlled room on a 12-h reverse light/dark cycle (7:00 AM lights on), with food and water *ad libitum*. All procedures were approved by the Ethics Committee on Experimental Animals of the Federal University of Pará under license number BIO-043-12 and followed the guidelines suggested by the NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.

Experimental groups

Animals were initially allocated to the following groups: distilled water (n=8) or ethanol (6.5 g/kg/day, 22.5% w/v) (n=8). Every day, rats were administered through orogastric cannula over a period of 55 days (i.e., until the 90th day of life) according to a procedure previously described (Livy et al., 2001; Maier and West, 2001; Maia et al., 2009; Oliveira et al., 2014; Teixeira et al., 2014). The current ethanol administration protocol was based on previous studies from our group (Maia et al., 2009; Teixeira et al., 2014; Oliveira et al., 2014) showing that ethanol intoxication (6.5 g/kg/day) in the developing central nervous system may induce long-lasting neurobehavioral impairments in rats. In order to investigate putative effects of ethanol exposure on overall poor nutrition levels, which may directly affect the quality of the tissues, we noted the animals' body weight, behavioral dysfunctions, loss or changes in hair coat, diarrhea, and edema during the entire period of ethanol administration (Campana et al., 1975).

Collection and preparation of tissue

After 7.5 hours of the last administration of alcohol, which is the period related to non-detectable amounts of ethanol in the blood (Livy et al., 2003), animals were anaesthetised with a mixture of ketamine hydrochloride (72 mg/kg, i.p.) and xylazine (9 mg/kg, i.p.) and then perfused with heparinized saline followed by paraformaldehyde 4%. The PG and SG were removed and weighed by analytical balance (FA 2104 N, Electronic Balance Bioprecisa, Shanghai, China). The relative glandular weight (RGW) was calculated by the formula: $RGW = \text{gland weight} \times 100 / \text{final body weight}$.

After weighing, glands were post-fixed in formalin solution (10%), and submitted to histological process by dehydration in increasing alcohol battery and xylene, and finally embedded in Paraplast[®] resin.

Histomorphometry

For histochemistry procedures, 7- μ m samples were cut from the region corresponding to the largest cross-sectional area of the organ with a microtome (RM2255, Leica Microsystems, Nussloch, Germany), deparaffinized in xylene, rehydrated in decreasing concentrations of alcohol and water, and finally stained with hematoxylin/eosin (HE). Thereafter, for morphometric analysis, the mean percentage equivalent to the glandular parenchyma and stroma region was evaluated.

The area of the samples was evaluated by counting point planimetry method. The sections were stained by HE and illustrative images from all experimental groups were obtained with a digital camera (Cyber-shot DSC-W230 4X optical zoom, Sony, Tokyo, Japan) attached to a stereo microscope (1.5x; Eclipse E200, Nikon, Tokyo,

Ethanol intoxication in salivary glands

Japan). Subsequently, we used five random sections per animal of both PG and SG computerized images, which were plotted in the computer monitor followed by overlapping of the grid of planimetry, which measures 21x16 cm and contains 2,852 points equidistant of 0.5 cm. Coincident points with parenchymal elements and stromal glandular were counted, and the percentage obtained of each region was calculated by the formulas: Morphometric Parenchymal Area (%MPA) = number of coincident points in the parenchymal x 100/ number total of points on the grid; and, Morphometric Stromal Area (%MSA) = number of coincident points in the stroma x 100/ number total of points on the grid (Borgers et al., 1993).

Immunohistochemistry

Immunohistochemical studies were performed on paraffin-embedded tissues using streptavidin (Spring bioscience, Pleasanton, USA) and 3,3-diaminobenzidine (DAB; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) methods. Briefly, 3- μ m sections were deparaffinized and rehydrated in decreasing concentration of alcohol battery. After antigen retrieval in chamber Pascal (S2800, Dako, Carpinteria, USA) and blocking of endogenous peroxidase activity, sections were incubated with the primary antibody anti- α smooth muscle actin (α -SMA) (1:50 dilution, Dako, Carpinteria, USA), a cytoplasmic myofilaments marker (Takahashi et al. 2001); anti-cytokeratin 19 (CK19) (1:100 dilution, Bioss, Boston, USA), a marker of intermediate filaments in the cytoplasm cells ductal (Fradette et al., 1998); and anti-caspase 3 (CAS) (1:250 dilution, Promega, Madison, USA), which reacts with the active form of caspase 3 and is associated with induction of apoptosis (Takahashi et al., 2004), in 0.1 M phosphate buffer saline (PBS). After, sections were submitted to streptavidin and revealed by DAB and counter-stained by Mayer hematoxylin methods.

Digital image analysis

Evaluation of immunostaining was performed by the percentage of labelled area of six regions randomly selected of each gland by the operator. Briefly, images selected were obtained by microscope (Axio Scope, Carl Zeiss, Jena, Germany) attached to the camera (AxioCam HRC, Carl Zeiss, Jena, Germany) with a magnification of 400x.

Digital images were prepared for analyses using ImageJ® software [Bethesda, Maryland, USA, (<http://rsb.info.nih.gov/ij/download.html>)]. According to Ruifrok and Johnston (2001), each color images were selected and separated from the rest of the field using image segmentation tool. CK19, CAS and α -SMA positive area (brown stain) and total gland area in the analysed field were automatically measured using color deconvolution plugin by calculating the contribution of each stain based on the stain-specific RGB absorption. In

our protocol, color deconvolution was used to separate DAB stain (positive areas) from hematoxylin (total area of the glands). Each image was changed to black/white color image. The measurements button was calibrated to calculate the area of the field (total gland area) and the area fraction (black color representing DAB stain). Finally, scores for CK19, CAS and α -SMA expression in the analysed field were calculated by the positively stained area over the total gland area.

Statistical analysis

All values are expressed as means + S.E.M. (n=8 animals per group). Statistical comparison was performed using Mann-Whitney test. The accepted level of significance was $p \leq 0.05$. All tests were performed using the GraphPad Prism software version 5.0 (San Diego, USA).

Results

Body weight of female rats in adulthood was not affected by chronic ethanol exposure during adolescence

As illustrated in Fig. 1, the chronic ethanol (6.5 g/kg/day) administration over a period of 55 days (i.e., from the 35th day until the 90th day of life) did not alter the final body weight of ethanol-treated rats.

Ethanol exposure increases PG weight, but does not change SG weight

The chronic ethanol (6.5 g/kg/day) administration over a period of 55 days (i.e., from the 35th day until the 90th day of life) induced a significant increase in the RGW of PG of female rats from the 35th to 90th days of life ($p < 0.001$). However, the total SG weight between control- and ethanol-treated rats after the period of 55 days of treatment did not differ statistically (Fig. 2).

Chronic ethanol exposure induces reduction and atrophy of PG glandular parenchyma and increases SG glandular stroma area

The histomorphometric results evaluated in the salivary glands are summarised in Fig. 3. Mann-Whitney test revealed that chronic ethanol exposure reduced the percentage of the parenchymal area of the PG ($p < 0.001$) that was not observed in the SG (Fig. 3A).

In addition, chronic ethanol exposure increased stromal area of SG ($p < 0.001$) that was not noticed in the PG (Fig. 3B).

Chronic ethanol intoxication during adolescence does not induce inflammatory infiltration in PG and SG

The HE method did not reveal inflammatory processes in the salivary glands of female rats after

Ethanol intoxication in salivary glands

chronic ethanol exposure during adolescence, from the 35th to 90th days of life (Fig. 4). In the PG and SG glands, control (Fig. 4A,C) and ethanol-treated groups (Fig. 4B,D), did not present periductal lymphocyte infiltration. Moreover, as demonstrated in the photomicrograph in Fig. 4D, rats chronically treated with ethanol during adolescence showed alterations in the SG, consisting of ductal-like structures (indicated by arrows).

Ethanol intoxication during adolescence induces reduction of CK19 expression in the PG and overexpression in the SG

The effects of chronic ethanol intoxication during

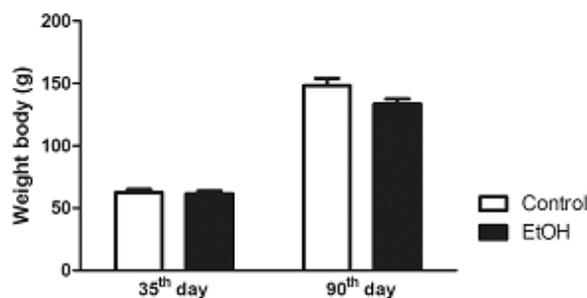


Fig. 1. Effects of chronic ethanol (EtOH) (6.5 g/kg/day) administration from adolescence (35 days old) to adulthood (90 days old) on body weight of female Wistar rats. The results are expressed as mean \pm S.E.M. of initial body weight and final body weight (g) (n=8 animals per group), (Mann-Whitney test).

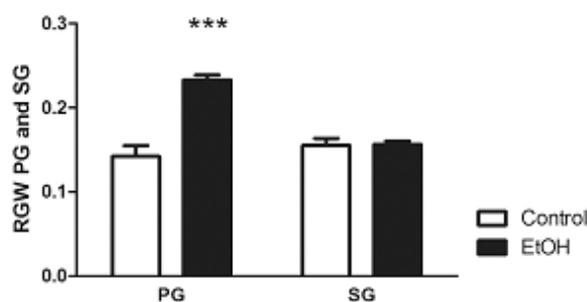


Fig. 2. Effects of chronic ethanol (EtOH) (6.5 g/kg/day) administration from adolescence (35 days old) to adulthood (90 days old) on relative glandular weight (RGW) of Parotid (PG) and Submandibular (SG) glands of female Wistar rats. The results are expressed as mean \pm S.E.M. of RGW (RGW=gland weight \times 100/final body weight) of PG and SG (n=8 animals per group). *** p \leq 0.001 compared to the control group (Mann-Whitney test).

adolescence on the labelling of three different antibodies in both PG and SG are illustrated in Figure 5. Mann-Whitney test revealed reduced α -SMA positive cells on the PG (p < 0.05) that was not noticed in SG (Fig. 5A). Of high importance, as detected in the sample images, rats chronically treated with ethanol during adolescence developed alterations in the tissue glands, in which both acinar and ductal cells were more dispersed than control group in SG and PG.

Moreover, CK19 positive cells were reduced in PG (p < 0.001) associated to contradictory increase in the SG (p < 0.01), detected through immunostaining method with CK19 antibody that labelled intercalated, striated and excretory ductal cells of female rats chronically treated with ethanol from adolescence till adulthood (Fig. 5B,E,H,K,N).

CAS-positive cells were observed in all groups analysed (Fig. 5F,I,L,O). Besides, chronic ethanol intoxication in rats increased CAS-positive cells in SG

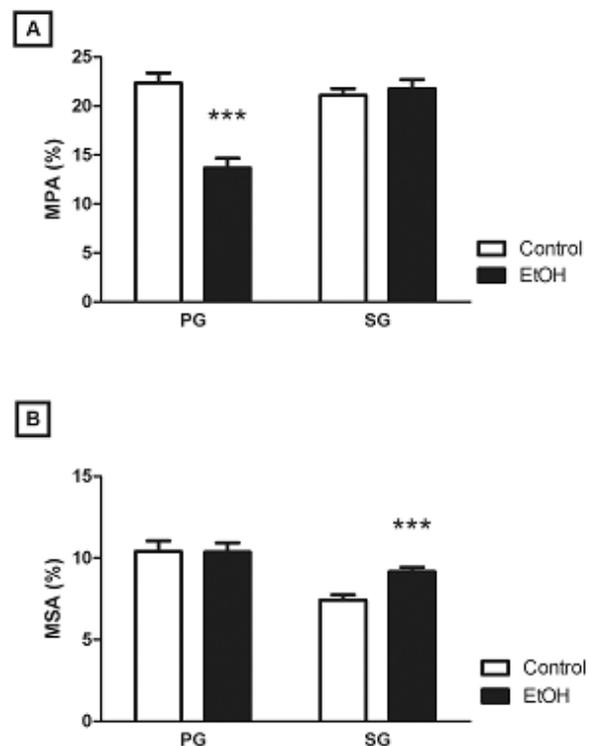


Fig. 3. Effects of chronic ethanol (EtOH) (6.5 g/kg/day) administration from adolescence (35 days old) to adulthood (90 days old) on morphometric evaluation of Parotid (PG) and Submandibular (SG) glands of female Wistar rats. The results are expressed as mean \pm S.E.M. Panel A represents the MPA- Morphometric Parenchymal Area (%); Panel B represents the MSA- Morphometric Stromal Area (%) (n=8 animals per group). *** p \leq 0.001 compared to the control group (Mann-Whitney test).

Ethanol intoxication in salivary glands

($p < 0.05$) but not in PG (Fig. 5C).

Discussion

In the present study, we investigated whether chronic ethanol exposure during adolescence affects the salivary glands in female rats. The current findings demonstrate, for the first time, that chronic ethanol exposure during adolescence induces parenchyma atrophy related to gland weight increases and reduction in ductal and myoepithelial cell population in the PG as evaluated in the histomorphometry and immunohistochemical analysis. Moreover, histological evaluation revealed that our alcohol exposure altered cell population in the SG, appearing ductal-type structures and inducing apoptosis. Heavy binge-drinking (i.e., high doses and long period of time) has increased worldwide mainly among

adolescents (Schuckit, 2009; INPAD, 2013). Therefore, our group has studied the effects of chronic ethanol exposure in body tissues in adolescent rats. Heavy chronic ethanol intoxication (6.5 g/kg/day) during adolescence induces long-lasting neurobehavioral impairments as well as brain histochemical damage (Oliveira et al., 2014; Teixeira et al., 2014). In this sense, our group also observed that chronic ethanol consumption from adolescence till adulthood alters the homeostasis of the oral cavity promoting alveolar bone loss in rats (Bannach et al., 2015).

It has been shown that chronic ethanol consumption induces glandular atrophy and reduces salivary flow rate, salivary protein and glycoprotein levels and electrolytes promoting, among alcoholics, worse dental state and significantly worse periodontal state (Waszkiewicz et al., 2013a,b). Whereas saliva ensures the homeostasis of the

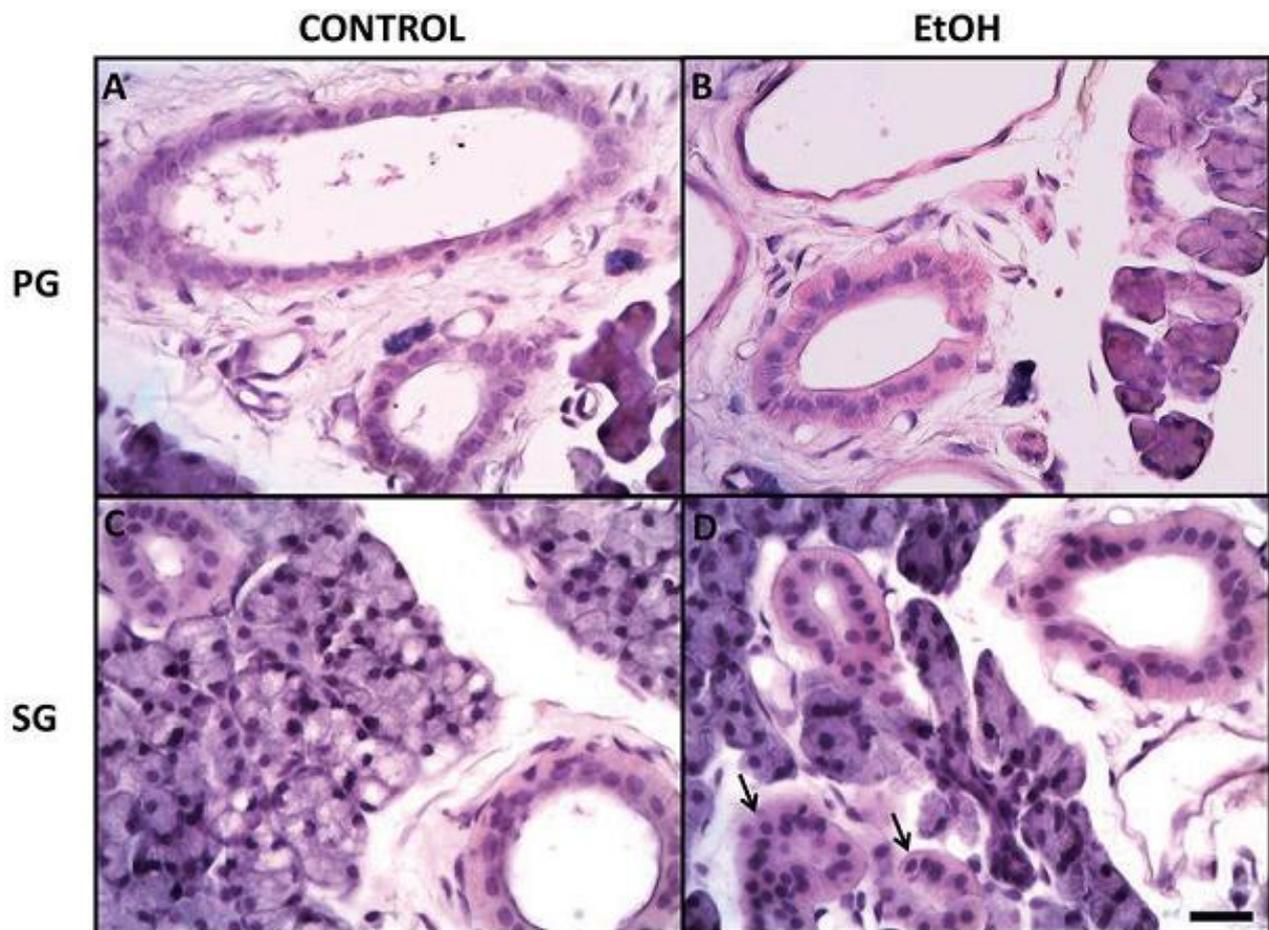


Fig. 4. Effects of chronic ethanol (EtOH) (6.5 g/kg/day) administration from adolescence (35 days old) to adulthood (90 days old) on histological sections of Parotid (PG) and Submandibular (SG) glands stained by hematoxylin/eosin (HE) of female Wistar rats. **Panel A** represents the PG of the control group; **Panel B** represents the PG of ethanol-treated group; **Panel C** represents the SG of the control group; **Panel D** represents the SG of ethanol-treated group. Arrows indicate ductal-like structures. Scale bar: 20 μ m.

Ethanol intoxication in salivary glands

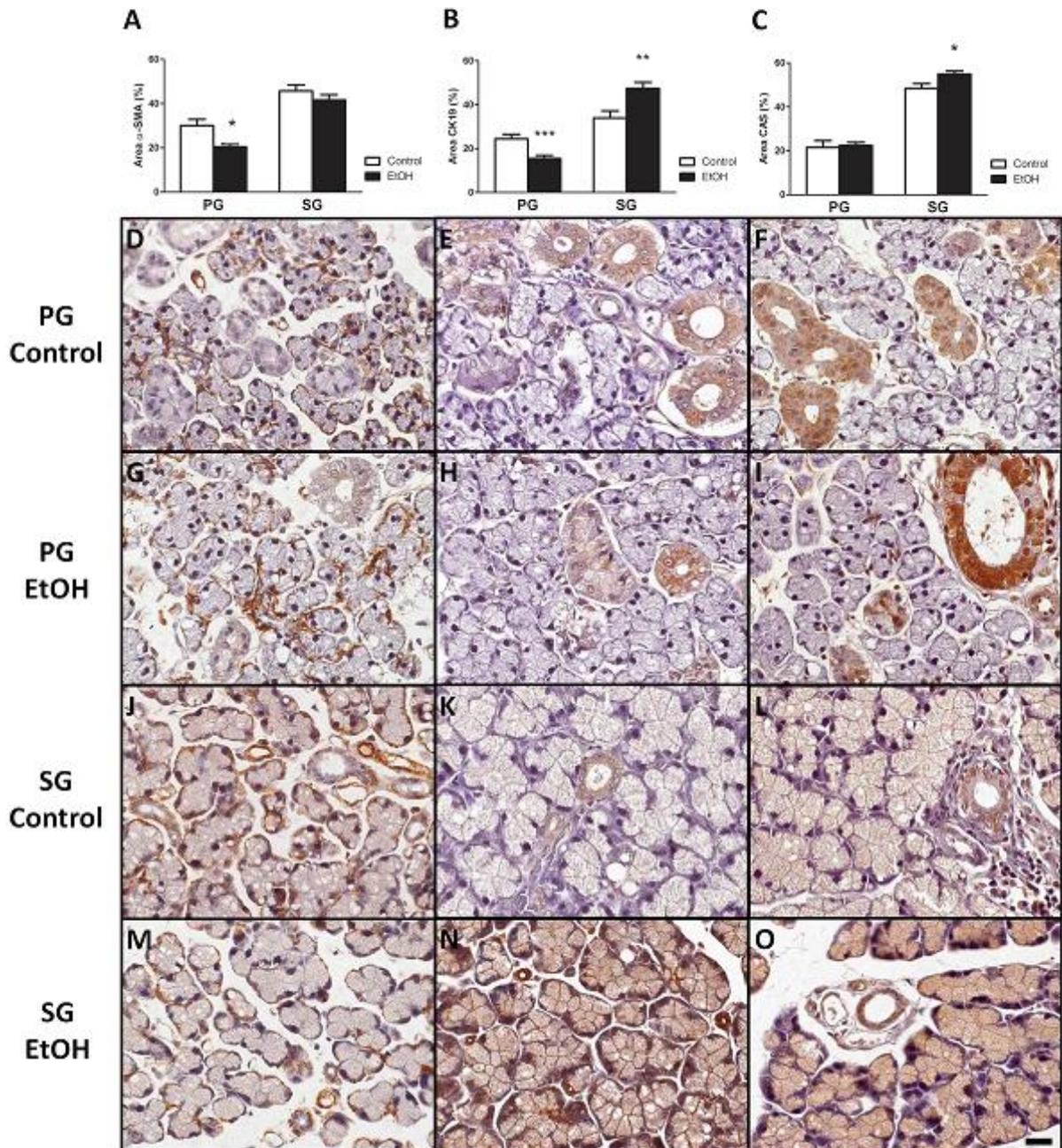


Fig. 5. Effects of chronic ethanol (EtOH) (6.5 g/kg/day) administration from adolescence (35 days old) to adulthood (90 days old) on Parotid (PG) and Submandibular (SG) glands immune expression of anti- α smooth muscle actin (α -SMA), anti-cytokeratin 19 (CK19), and anti-caspase 3 (CAS) positive cells of female Wistar rats. The results are expressed as mean \pm S.E.M. **Panel A** represents the labelled fraction area (%) of α -SMA positive cells; **Panel B** represents the labelled fraction area (%) of CK19 positive cells; **Panel C** represents the labelled fraction area (%) of CAS positive cells. Labelled fraction area (%) was calculated by positively stained area over the total glandular area. Photomicrographs illustrate immunohistochemical staining of antibodies α -SMA (panels D, G, J, M), CK19 (panels E, H, K, N) and CAS (panels F, I, L, O) in PG and SG (n=8 animals per group). * p <0.05 compared to the control group, ** p < 0.01 compared to the control group, *** p < 0.001 compared to the control group (Mann-Whitney test). Scale bar: 20 μ m.

Ethanol intoxication in salivary glands

oral environment, defence of the oral cavity, oropharynx and upper region of the gastrointestinal tract, and protection of hard and soft tissues of the oral cavity as well as of the teeth and periodont (Pronko et al., 2002; Prestifilippo et al., 2009), saliva flow rate reduced may induce oral cavity vulnerability. Thereby, investigations are necessary about alterations that chronic ethanol consumption induce on salivary gland tissues.

Studies have demonstrated that alcohol exposure affects salivary glands, inducing fat accumulation, acini cell swelling and reduction of protein content in the PG. Besides, salivary flow rate was reduced related to gland atrophy of the secretory parenchyma (Scott et al., 1988; Maier et al., 1990; Banderas et al., 1992; Riedel et al., 2003; Carranza et al., 2005). However, the effects on the gland size after ethanol exposure remain unclear (Mandel and Baurmash, 1971; Maier et al., 1986; Scott et al., 1988; Campos et al., 2005; Mandel et al., 2005).

Ethanol intoxication protocol used in our study revealed weight increase of PG (but not SG). Similar results were found in Campos and colleagues study (Campos et al., 2005). On the contrary, Maier et al. (1986) related that chronic ethanol exposure reduced the PG weight, not affecting SG.

The effects of heavy alcohol consumption on nutrition are well recognized and may contribute to poor development of organs (Campos et al., 2005). The malnutrition status may alter the physiology and morphology of salivary glands (Nör et al., 2013) which in rodents is characterized by behavioral dysfunction, loss or changes in hair coat, diarrhea, and edema, apart from remarkable weight loss (Campana et al., 1975). In fact, in the present study was not reveal any of malnutrition characteristics in the female rats in the adulthood, as previously observed in Oliveira et al. (2014) study. However, our data demonstrated PG atrophy (observed in the parenchyma area reduced) associated to weight increased displayed by alcohol exposure as previously reported by Campos and colleagues (2005) that noticed a weight gain and salivary gland atrophy in PG (Riedel et al., 2003; Maier et al., 1986). Moreover, glandular atrophy depends on the dose and duration of ethanol consumption (Scott et al., 1988), but accurate data related to the minimum period required for atrophy is poorly understood.

Besides, our results also reveal that the stroma area of SG was increased which was not followed by inflammatory process, since there was not noticed inflammatory infiltration in the glandular stroma. Our results are contradictory to other studies that claim that chronic ethanol intoxication increased periductal lymphocyte infiltration (Dale, 2001; Carda et al., 2005). However, it is well reported that chronic alcoholism is one of the primary causes of sialadenosis, a non-inflammatory pathology that induces glandular enlargement and alters gland weight (Mandiy and Suraffanon, 2002), which could partially explain our findings.

Furthermore, the glandular atrophy produced by

alcohol exposure is associated with increased proliferative activity of the oral mucosa epithelium that may be caused by ethanol cytotoxic effect (Riedel et al., 2003). Recent study in rats (Nör et al., 2013) demonstrated that chronic ethanol exposure during adulthood associated to SG partially removed induced cell proliferative profile and enhanced convoluted ducts that are a source of growth factors and are present in the SG but not PG (Amano et al., 2012), at the 7th post-surgical day. In the present study, chronic ethanol intoxication during 55 days showed increased expression of CK19 and appearing ductal-type structures in the SG, however, reduction in CK19 expression in PG after a harmful stimulus.

Cytokeratins are epithelium-specific intermediate filament proteins that support cellular integrity, contributing to cell attachments (Fradette et al., 1998). However, previous studies affirm that CK19 overexpression by suprabasal cells of the oral mucosa indicates cell dysfunction and probable premalignant changes (Michel et al., 1996; Zhong et al., 2007). On the other hand, long-term glandular atrophy leads to a reduction in ductal cells in PG (Walker and Gobé, 1987). Considering that ductal cells in the total SG volume is about 20% compared to PG (5%) and these cells exhibit characteristics of resistance, we suggest that SG may be less susceptible to stressor factors (i.e., alcohol exposure) than PG, since the SG presents resistance factors in higher proportion than PG (Dehaye and Turner, 1991; Burgess and Dardick, 1998). However, the present results cannot provide direct evidence to account for these changes or the mechanisms responsible for gland alteration.

The immunohistochemistry performed to identify myoepithelial cells showed reduced labelling intensity in the samples from the ethanol group in PG but not SG. According to studies with experimental induction of ductal atrophy by other mechanisms (i.e., ligature), the persistence of experimental induction of ductal atrophy promotes reduced population of myoepithelial cells (Burgess et al., 1996; Burgess and Dardick, 1998). In this sense, our study showed that myoepithelial cell population of the glandular parenchyma in PG was reduced by chronic stress caused by ethanol intake during adolescence.

The caspase 3-positive cells found in the glands were presented in ductal and acini cells. It has also been reported that apoptosis participates in progressive and regressive processes which occurs both in development and regeneration process of salivary gland (Takahashi et al., 2004). Apoptosis contributes to the deletion of terminal tubule cells (Hecht et al., 2000) and lumen formation of ducts (Jaskoll and Melnick, 1999). In our study, after alcohol intoxication during adolescence, apoptotic cell immunostaining in the treated group was increased in SG but not in PG. However, the mechanisms that induce caspase-3 levels in the SG, but not PG are not understood. Campos et al. (2005) reported that the biochemical mechanisms of both glands

are diverse, PG have a predominantly aerobic biochemical mechanism, while SG have a predominantly anaerobic mechanism. Such differences may indicate that the events of cell death in PG (more susceptible to oxidative damage) differ from occurring in SG, which this could be more susceptible to apoptotic events

For the first time, our study performed immunohistochemical analyses by three different antibodies in order to investigate the cell-type and mechanisms involved in the damage of chronic ethanol intoxication during adolescence. The anti CK19 e anti α -SMA are specific markers of glandular salivary cells that label ductal and myoepithelial cells respectively, which are very important to salivary gland morphology and physiology studies. Indeed, α -SMA is the marker of myoepithelial cells more indicated to studies in glandular tissue and was performed in this study (Takahashi et al., 1999). Therefore, we investigated whether ethanol exposure alters specific proteins and/or induces apoptosis in the parenchyma glandular cells. It is well noticed that previous immunohistochemical studies that assess atrophy in salivary glands are related to identification the diagnosis, or in experimental conditions, are caused by ductal ligation as noxious stimulus (Burgess et al., 1996; Burgess and Dardick, 1998; Takahashi et al., 1998; Safadi et al., 2010; Laco et al., 2012). Thereby, our study emerges as a relevant work that highlight the immunohistochemical evaluation in salivary glands after damage produced by chronic chemical stimulus.

In conclusion, our results provide new evidence that ethanol exposure during adolescence induces PG atrophy, but not SG. Paradoxically, alcohol exposure induced the occurrence of increased duct-like cells related to caspase-3 overexpression in SG. Of significance are the current findings indicating that differences between both PG and SG have been demonstrated. The exact mechanisms involved in the observed harmful alcohol effects in PG, as well as proliferating capacity of duct cells in SG should be investigated in future research, but the present data provide evidence that alcohol during adolescence damages salivary glands.

Acknowledgements. Luanna de Melo Pereira Fernandes was supported by Research Support Foundation of the State of Pará (FAPESPA). Also, we would like to thank FAPESPA for providing financial support. The authors have no financial or personal conflicts of interest related to this work.

References

- Actis A.B., Lampe P.D and Eynard A.R. (2002). Cellular basis and clinical implications of biological markers in salivary tissues: their topological distribution in murine submandibular gland. *Oral Oncol.* 38, 441-449.
- Amano O., Mizobe K., Bando Y. and Sakiyama K. (2012). Anatomy and histology of rodent and human major salivary glands. *Acta Histochem. Cytochem.* 45, 241-250.
- Bagyánszki M., Krecsmarik M., De Winter B.Y., De Man J.G., Fekete E., Pelckmans P.A., Adriaensen D., Kroese A., Nassauw L.V. and Timmermans J.P. (2010). Chronic alcohol consumption affects gastrointestinal motility and reduces the proportion of neuronal NOS-immunoreactive myenteric neurons in the murine jejunum. *Anat. Rec. (Hoboken).* 293, 1536-1542.
- Banderas J.A., Gaitan L.A., Portilla J. and Aguirre, A. (1992). Effects of chronic ethanol consumption on the rat parotid gland. *Arch. Oral Biol.* 37, 69-72.
- Bannach S.V., Teixeira F.B., Fernandes L.M., Ferreira R.O., Santana L.N., Fontes-Júnior E.A., Oliveira G.B. and Prediger R.D. (2015). Alveolar bone loss induced by chronic ethanol consumption from adolescence to adulthood in Wistar rats. *Indian J. Exp. Biol.* 53, 93-97.
- Bohl L., Merlo C., Carda C., Gómez de Ferraris M.E. and Carranza M. (2008). Morphometric analysis of the parotid gland affected by alcoholic sialosis. *J. Oral Pathol. Med.* 37, 499-503.
- Borgers M., Thoné F., Wouters L., Ausma J., Shivalkar B. and Flameng W. (1993). Structural correlates of regional myocardial dysfunction in patients with critical coronary artery stenosis: Chronic hibernation? *Cardiovasc. Pathol.* 2, 237-245.
- Burgess K.L. and Dardick I. (1998). Cell population changes during atrophy and regeneration of rat parotid gland. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* 85, 699-706
- Burgess K.L., Dardick I., Cummins M.M., Burford-Mason A.P., Bassett R. and Brown D.H. (1996). Myoepithelial cells actively proliferate during atrophy of rat parotid gland. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* 82, 674-680.
- Campana A.O., Burini R.C., Outa A.Y. and DeCamargo J.L. (1975). Experimental protein deficiency in adult rats. *Rev. Bras. Pesqui. Med. Biol.* 8, 221-226.
- Campos S.C.G., Moreira D.A.C., Nunes T.D.S., Colepicolo P. and Brigagão M.R.P.L. (2005). Oxidative stress in alcohol-induced rat parotid sialadenosis. *Arch. Oral Biol.* 50, 661-668.
- Carda C., Carranza M., Arriaga A., Diaz A., Peydró A. and Gomez de Ferraris M. (2005). Structural differences between alcoholic and diabetic parotid sialosis. *Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal.* 10, 309-314.
- Carranza M., Ferraris M.E. and Galizzi M. (2005). Structural and morphometrical study in glandular parenchyma from alcoholic sialosis. *J. Oral Pathol. Med.* 34, 374-379.
- Carrard V.C., Mendez M., Nolde J., Fossati A.C.M. and Filho M.S. (2007). Influência do consumo de etanol nas glândulas salivares. *Sci. Med.* 17, 87-92.
- Dale A.C. (2001). *Histologia bucal: desenvolvimento, estrutura e função.* Rio de Janeiro. Guanabara Koogan.
- Dehaye J.P. and Turner R.J. (1991). Isolation and characterization of rat submandibular intralobular ducts. *Am. J. Physiol.* 261, C490-496.
- Faustino S.E.S. and Stipp A.C.M. (2003). Efeitos do alcoolismo crônico e da desintoxicação alcóolica sobre a glândula submandibular de ratos. Estudo morfométrico. *J. Appl. Oral Sci.* 11, 21-26.
- Ferraris M.E., Carranza M., Ferraris R. and Fili T. (1995). Variaciones estructurales en glândulas salivales de alcohólicos crônicos. *Rev. Fac. Odontol. Univ. Nac. Colomb.* 20, 59-68.
- Ferraris M., Arriaga A., Busso C. and Carranza M. (1999). Histological study of parotid, submaxillary and von Ebner salivary glands in chronic alcoholics. *Acta Odontol. Latinoam.* 12, 97-102.
- Fradette J., Germain L., Seshalah P. and Coulombe P.A. (1998). The type I keratin 19 possesses distinct and context-dependent

Ethanol intoxication in salivary glands

- assembly properties. *J. Biol. Chem.* 276, 35176-35184.
- Friedlander A.H., Marder S.R., Pisegna J.R. and Yagiela J.A. (2003). Structural variations in salivary glands of chronic alcoholic patients. *J. Am. Dent. Assoc.* 134, 731-740.
- Gifford A.N., Espallat M.P. and Gatley S.J. (2008). Biodistribution of radiolabeled ethanol in rodents. *Drug Metab. Dispos.* 36, 1853-1858.
- Hecht R., Connelly M., Marchetti L., Ball W.D. and Hand A.R. (2000). Cell death during development of intercalated ducts in the rat submandibular gland. *Anat. Rec. (Hoboken)*. 258, 349-358.
- INPAD-Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Políticas Públicas do Álcool e Outras Drogas (2013). II Levantamento Nacional de Álcool e Drogas (LENAD). <http://inpad.org.br/lenad/alcool/resultados-preliminares>. Accessed in: 25/08/2013.
- Jaskoll T. and Melnick M. (1999). Submandibular gland morphogenesis: stage-specific expression of TGF- α /EGF, IGF, TGF- β , TNF, and IL-6 signal transduction in normal embryonic mice and the phenotypic effects of TGF- β 2, TGF- β 3, and EGF-*r* null mutations. *Anat. Rec. (Hoboken)*. 256, 252-268.
- Katchburian E. and Arana V. (2004). Histologia e embriologia oral. In: Texto, atlas, correlações clínicas. 2nd ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan S.A.
- Laco J., Kamarádová K., Vítková P., Sehnáková E., Dvořáková S., Václavíková E., Sýkorová V., Kašpírková J., Skálová A. and Rýška A. (2012). Cribriform adenocarcinoma of minor salivary glands may express galectin-3, cytokeratin 19, and HBME-1 and contains polymorphisms of RET and H-RAS proto-oncogenes. *Virchows Arch.* 461, 531-540.
- Lieber C.S. (1991). Hepatic, metabolic and toxic effects of ethanol. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 15, 573-592.
- Livy D.J., Maier S.E. and West J.R. (2001). Fetal alcohol exposure and temporal vulnerability: Effects of binge-like alcohol exposure on the ventrolateral nucleus of the thalamus. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 25, 774-780.
- Livy D.J., Parnell S.E. and West J.R. (2003). Blood ethanol concentration profiles: a comparison between rats and mice. *Alcoholism* 29, 165-171.
- Maia C.S.F., Lucena G.M.R.S., Corrêa P.B.F., Serra R.B., Matos R.W.M., Menezes F.C., Santos S.N., Sousa J.B., Costa E.T. and Ferreira V.M.M. (2009). Interference of ethanol and methylmercury in the developing central nervous system. *Neurotoxicology* 30, 23-30.
- Maier S.E. and West J.R. (2001). Regional differences in cell loss associated with binge-like alcohol exposure during the first two trimesters equivalent in the rat. *Alcoholism* 23, 49-57.
- Maier H., Born I.A., Veith S., Adler D. and Seitz H.K. (1986). The effect of chronic ethanol consumption on salivary gland morphology and function in the rat. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 10, 425-427.
- Maier H., Born I.A. and Mall G. (1988a). Effect of chronic ethanol and nicotine consumption on the function and morphology of the salivary glands. *Klin. Wochenschr.* 66, 140-150.
- Maier H., Born I.A. and Veith S. (1988b). The effect of ethanol consumption on salivary gland morphology and function in the rat. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 10, 425-429.
- Maier H., Seitz H.K., Mayer B., Adler D., Mall G. and Born I.A. (1990). Lipomatous atrophy of the parotid gland in chronic alcohol consumption. *Laryngorhinootologie* 69, 600-604.
- Mandel L. and Baurmash H. (1971). Parotid enlargement due to alcoholism. *J. Am. Dent. Assoc.* 82, 369-373.
- Mandel L., Vakkas J. and Saqi A. (2005). Alcoholic (Beer) sialosis. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 63, 402-405.
- Mandy L. and Suraffanon F. (2002). Bilateral parotid swelling: a review. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* 93, 221-237.
- Mascres C., Ming-Wen F. and Joly J.G. (1984). Morphologic changes of the esophageal mucosa in the rat after chronic alcohol ingestion. *Exp. Pathol.* 25, 147-153.
- Michel M., Török N., Godbout M.J., Lussier M., Gaudreau P., Royal A. and Germain L. (1996). Keratin 19 as a biochemical marker of skin stem cells in vivo and in vitro: keratin 19 expressing cells are differentially localized in function of anatomic sites, and their number varies with donor age and culture stage. *J. Cell Sci.* 109, 1017-28.
- Molina P.E., McClain C., Valla D., Guidot D., Diehl A.M., Lang C.H. and Neuman M. (2002). Molecular pathology and clinical aspects of alcohol induced tissue injury. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 26, 120-128.
- Nör F., Hartmann M.D., Slongo P.R., Lamers R.L. and Fossati A.C. (2013). Chronic alcohol consumption promotes alterations on salivary gland regeneration process. *Microsc. Res. Tech.* 76, 1125-1130.
- Oliveira G.B., Fontes E. Jr, de Carvalho S., da Silva J.B., Fernandes L.M., Oliveira M.C., Prediger R.D., Gomes-Leal W., Rodrigues L.R. and Maia C.S. (2014). Minocycline mitigates motor impairments and cortical neuronal loss induced by focal ischemia in rats chronically exposed to ethanol during adolescence. *Brain Res.* 1561, 23-34.
- Orabi A.I., Shah A.U., Müll K., Luo Y., Mahmood S.M., Ahmad A., Reed A. and Husain S.Z. (2011). Ethanol enhances carbachol-induced protease activation and accelerates Ca²⁺ waves in isolated rat pancreatic acini. *J. Biol. Chem.* 286, 14090-14097.
- Owczarek J., Jasinska M. and Orszulak-Michalak D. (2005). Drug-induced myopathies. An overview of the possible mechanisms. *Pharmacol. Rep.* 57, 23-34.
- Prestifilippo J.P., Fernández-Solari J., Medina V., Rettori V. and Elverdin J.C. (2009). Pharmacology and cell metabolism role of the endocannabinoid system in ethanol-induced inhibition of salivary secretion. *Alcohol Alcohol.* 44, 443-448.
- Pronko P., Bardina L., Satanovskaya V., Kuzmich A. and Zimatkin S. (2002). Effect of chronic alcohol consumption on the ethanol- and acetaldehyde-metabolizing systems in the rat gastrointestinal tract. *Alcohol Alcohol.* 37, 229-335.
- Riedel F., Goessler U. and Hörmann K. (2003). Alcohol-related diseases of the mouth and throat. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 17, 543-555.
- Ruffrok A.C. and Johnston D.A. (2001). Quantification of histochemical staining by color deconvolution. *Anal. Quant. Cytol. Histol.* 23, 291-299.
- Safadi R.A., Musleh A.S., Al-Khateeb T.H. and Hamasha A.A. (2010). Analysis of immunohistochemical expression of k19 in oral epithelial dysplasia and oral squamous cell carcinoma using color deconvolution-image analysis method. *Head Neck Pathol.* 4, 282-289.
- Schuckit M.A. (2009). Alcohol-use disorders. *Lancet* 373, 492-501.
- Scott J., Flower E.A. and Burns J. (1987). A quantitative study of histological changes in the human parotid gland occurring with adult age. *J. Oral Pathol.* 16, 505-510.
- Scott J., Burns J. and Flower E. (1988). Histological analysis of parotid and submandibular glands in chronic alcohol abuse: a necropsy study. *J. Clin. Pathol.* 41, 837-840.
- Takahashi S., Schoch E. and Walker N.I. (1998). Origin of acinar cell regeneration after atrophy of the rat parotid induced by duct obstruction. *Int. J. Exp. Pathol.* 79, 293-301.

Ethanol intoxication in salivary glands

- Takahashi S., Nakamura S., Suzuki R., Domon T., Yamamoto T., Wakita M. (1999). Changing myoepithelial cell distribution during regeneration of rat parotid glands. *Int. J. Exp. Pathol.* 80, 283-290.
- Takahashi S., Nakamura S., Shinzato K., Domon T., Yamamoto T. and Wakita M. (2001). Apoptosis and proliferation of myoepithelial cells in atrophic rat submandibular glands. *J. Histochem. Cytochem.* 49, 1557-1563.
- Takahashi S., Shinzato K., Nakamura S., Domon T., Yamamoto T., Wakita M. (2004). Cell death and cell proliferation in the regeneration of atrophied rat submandibular glands after duct ligation. *J. Oral Pathol. Med.* 33, 23-29.
- Teixeira F.B., Santana L.N., Bezerra F.R., De Carvalho S., Fontes-Júnior E.A., Prediger R.D., Crespo-López M.E., Maia C.S. and Lima R.R. (2014). Chronic ethanol exposure during adolescence in rats induces motor impairments and cerebral cortex damage associated with oxidative stress. *PLoS One* 9, e101074.
- Walker N.I. and Gobé G.C. (1987). Cell death and cell proliferation during atrophy of the rat parotid gland induced by duct obstruction. *J. Pathol.* 153, 333-344.
- Waszkiewicz N., Chojnowska S., Zalewska A., Zwierz K., Szulc A. and Szajda S.D. (2013a). Salivary hexosaminidase in smoking alcoholics with bad periodontal and dental states. *Drug Alcohol Depend.* 129, 33-40.
- Waszkiewicz N., Zalewska-Szajda B., Chojnowska S., Szajda S.D., Zalewska A., Konarzewska B., Szulc A., Wojtulewska-Supron A., Kwpka A., Knás M., Aadny J.R., Milewski R. and Zwierz K. (2013b). The salivary HEX A% index as an excellent marker of periodontitis in smoking alcohol-dependent persons. *Dis. Markers* 35, 457-463.
- Zhong B., Strnad P., Toivola D.M., Tao G.Z., Ji X., Greenberg H.B. and Omary M.B. (2007). Reg-II is an exocrine pancreas injury-response product that is up-regulated by keratin absence or mutation. *Mol. Biol. Cell.* 18, 4969-4978.

Accepted March 12, 2015

ANEXO B – Apreciação do Comitê de Ética

**PARECER 196-14**

Projeto: AVALIAÇÃO NEUROCOMPORTAMENTAL, IMUNOISTOQUÍMICA E OXIDATIVA DE RATAS INTOXICADAS COM ETANOL DA ADOLESCÊNCIA À FASE ADULTA, EM PADRÃO *BINGE*.

Coordenador: Professora. Dra. Cristiane do Socorro Ferraz Maia

Área Temática: Farmácia

Vigência: 04/2014 a 04/2016

No no CEPAE-UFGA: 196-14

O projeto acima identificado foi avaliado pelo Comitê de Ética Em Pesquisa Com Animais de Experimentação da Universidade Federal do Pará (CEPAE). O tema eleito para a investigação e de alto teor científico justificando a utilização do modelo animal proposto. Os procedimentos experimentais utilizados seguem as normas locais e internacionais para tratamento e manipulação de animais de experimentação. Portanto, o CEPAE, através de seu presidente, no uso das atribuições delegadas pela portaria No 3988/2011 do Reitor da Universidade Federal do Pará, resolve **APROVAR** a utilização de animais de experimentação (N=80, ratos Wistar) nas atividades do projeto em questão, no período de vigência estabelecido.

As atividades experimentais fora do período de vigência devem receber nova autorização deste comitê.

Belém, 02 março de 2014


Prof. Dr. Wallace Gomes Leal
Presidente do CEPAE-UFGA