



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

Taiana Cristina Vilhena Sarmento Carvalheiro

**Em diferentes períodos do desenvolvimento cerebral, o
aprendizado espacial e a flexibilidade cognitiva são
igualmente sensíveis à retirada do etanol em *binge
drinking*?**

BELÉM – PA

2019

Taiana Cristina Vilhena Sarmiento Carvalheiro

**Em diferentes períodos do desenvolvimento cerebral, o
aprendizado espacial e a flexibilidade cognitiva são
igualmente sensíveis à retirada do etanol em *binge
drinking*?**

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará – UFPa, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas – área de concentração: Farmacologia e Comportamento.

**Orientadora: Profa. Dra. Cristiane do Socorro Ferraz
Maia.**

**Co-Orientadora: Profa. Dra. Luanna de Melo Pereira
Fernandes.**

BELÉM – PA

2019

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

V711d Vilhena Sarmiento Carvalheiro, Taiana Cristina
Em diferentes períodos do desenvolvimento cerebral, o
aprendizado espacial e a flexibilidade cognitiva são
igualmente sensíveis à retirada do etanol em binge drinking?
/ Taiana Cristina Vilhena Sarmiento Carvalheiro. — 2019.
64 f. : il. color.

Orientador(a): Prof^a. Dra. Cristiane do Socorro Ferraz
Maia

Coorientação: Prof^a. Dra. Luanna de Melo Pereira
Fernandes

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas, Instituto de Ciências da Saúde,
Universidade Federal do Pará, Belém, 2019.

1. Biblioteca universitária. I. Título.

CDD 615

DEDICATÓRIA

Àqueles que são minha força, meu acalanto e minha inspiração, meus pais Alvanir e Consuêlo Carvalheiro. Ao meu conselheiro e fiel amigo de todas as horas, meu irmão Diego Vilhena S. Carvalheiro. Ao meu grande e incansável companheiro de vida, meu noivo Rafael Simas.

AGRADECIMENTOS

À Deus que tem me guiado e me sustentado em todos os momentos de minha vida e com misericórdia infinita me leva adiante mesmo no cansaço.

Ao Sagrado Coração de Jesus, onde confio inteiramente minha vida e todos os meus planos.

À Nossa Senhora de Nazaré, minha mãe amável que, como coração bondoso, jamais me desamparou em minhas súplicas.

Aos meus pais, por todo o apoio e amor. Obrigada por tanta dedicação ao nosso lar e por jamais deixarem faltar educação e fé a mim e ao meu irmão. Vocês são fonte inesgotável de inspiração para mim e tudo o que faço tenho vocês como exemplo a ser seguido.

Ao meu grande amigo, meu irmão amado, que sempre está ao meu lado. Nossa união e nosso amor me sustentam.

Ao meu noivo, incansável parceiro em todos os momentos desta longa caminhada. Obrigada por seguir me apoiando e tornando este percurso menos árduo.

Às minhas amigas de mestrado e de vida, Mayara e Mayra Arouck e Paula Ribera, por compartilharem comigo tantos momentos. A companhia de vocês foi fundamental nesta batalha.

Aos meus amigos de laboratório, sempre tão pacientes e solícitos, cada um de vocês é um tijolinho lindo de Deus na construção da minha vida. Em especial à Leticia, Igor e Chirlene pelo comprometimento e responsabilidade assumidos neste trabalho.

À Sabrina Carvalho, que muito mais que amiga para mim se tornou uma grande irmã. Obrigada pelo laço de doação e confiança que construímos juntas.

À minha Co-Orientadora e grande amiga Dra. Luanna Fernandes, eu jamais conseguirei dimensionar o tamanho do meu carinho, admiração, apreço e respeito por você. Você mora para sempre em meu coração!

À minha Orientadora, Dra. Cristiane Maia, por acreditar em mim quando muitas vezes eu mesma duvidei. Obrigada pelas conversas amigas, por ser tão humana e paciente quando mais precisei e pela arte de contribuir cientificamente em minha vida.

Ao Prof. Dr. Enéas de Andrade Fontes Junior pela paciência de sempre e por permitir que eu faça parte desta equipe maravilhosa que compõe o LAFICO.

À parceria incansável do coordenador Nelson do Centro de Perícias Científicas Renato Chaves onde foram realizadas as dosagens alcoólicas essenciais na construção deste trabalho.

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 Ciências Farmacêuticas pela oportunidade e responsabilidade com este estudo.

À CAPES pelo auxílio financeiro que fomentou esta pesquisa.

EPÍGRAFE

“Todos vocês sabem, no seu coração e no seu íntimo, que o Senhor, nosso Deus, lhes deu todas as coisas boas que havia prometido. Ele cumpriu tudo; não falhou em nada.”

(Josué 23:14)

RESUMO

EM DIFERENTES PERÍODOS DO DESENVOLVIMENTO CEREBRAL O APRENDIZADO ESPACIAL E A FLEXIBILIDADE COGNITIVA SÃO IGUALMENTE SENSÍVEIS À RETIRADA DO ETANOL EM *BINGE DRINKING*?

O Etanol (EtOH) é a droga recreativa mais utilizada entre todo o público etário e seu consumo no padrão *binge drinking* (BD) tem aumentado no gênero feminino. Isto tem sido amplamente relacionado à incidência de problemas mentais, déficits comportamentais e distúrbios que favorecem a dependência alcoólica, assim como o uso de outras substâncias. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi identificar de que maneira diferentes estágios da maturação cerebral são afetados pelo padrão episódico e intermitente de etanol e como isto reflete nas atividades cognitivas referentes à aprendizagem espacial e flexibilidade cognitiva através do Teste do Labirinto Aquático. Após administração oral de EtOH em BD (3 dias on/ 4 dias off) durante toda a adolescência e vida adulta, na dose de 3 g/kg/dia. Na adolescência, os resultados demonstraram que nos dias subsequentes ao tratamento, os animais anteriormente expostos ao EtOH não apresentaram prejuízo sobre a aprendizagem espacial e a flexibilidade cognitiva em relação aos animais do grupo controle. Em contrapartida, os animais adultos demonstraram prejuízo sobre a flexibilidade cognitiva após retirada do EtOH em BD. Além disto, as concentrações de EtOH encontradas na circulação sanguínea 1h após a última dose da droga, conferem ao padrão de exposição utilizado neste estudo a característica de um protocolo de EtOH em BD. Desta forma, no protocolo de dose e período de exposição adotados neste trabalho, nossos resultados sugerem que a retirada do EtOH em BD na adolescência não foi suficientemente capaz de promover danos à aprendizagem e aquisição de novas memórias espaciais após a retirada desta substância, mas não de forma semelhante em animais adultos.

Palavras-chave: Aprendizagem. Binge drinking. Etanol. Flexibilidade cognitiva. Maturação cerebral. Neurogênese.

ABSTRACT

IN DIFFERENT PERIODS OF CEREBRAL DEVELOPMENT ARE SPACE LEARNING AND COGNITIVE FLEXIBILITY ALSO SENSITIVE TO THE WITHDRAWAL OF ETHANOL IN BINGE DRINKING?

Ethanol (EtOH) is the most widely used recreational drug among all age groups and its consumption in the standard binge drinking (BD) has increased in the female gender. This has been largely related to the incidence of mental problems, behavioral deficits and disorders that favor alcohol dependence, as well as the use of other substances. In this way, the objective of this work was to identify how different stages of brain maturation are affected by the episodic and intermittent pattern of ethanol and how this reflects in the cognitive activities related to spatial learning and cognitive flexibility through the Aquatic Labyrinth Test. After oral administration of EtOH in BD (3 days on / 4 days off) throughout adolescence and adult life at the dose of 3 g / kg / day. In the adolescence, the results showed that in the days following the treatment, the animals previously exposed to EtOH did not present any impairment on the spatial learning and the cognitive flexibility in relation to the animals of the control group. In contrast, adult animals demonstrated impairment on cognitive flexibility after removal of EtOH from BD. Furthermore, the EtOH concentrations found in the bloodstream 1h after the last dose of the drug, confer the characteristic of an EtOH protocol in BD to the exposure pattern used in this study. Thus, in the protocol of dose and exposure period adopted in this work, our results suggest that the withdrawal of EtOH in BD in adolescence was not sufficiently capable of promoting damage to learning and acquisition of new spatial memories after withdrawal of this substance, but not similarly in adult animals.

Keywords: Binge drinking. Brain maturation. Cognitive flexibility. Ethanol. Learning. Neurogenesis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|--|----|
| Figura 1: Vias metabólicas centrais e periféricas do etanol..... | 17 |
| Figura 2: Tratamento experimental em binge drinking de etanol (3g/kg/dia) e água destilada. | 28 |
| Figura 3: Desenho esquemático da Fase de Treinamento da Aprendizagem no Teste do Labirinto Aquático..... | 30 |
| Figura 4: Desenho esquemático da Fase de Treinamento da Reversão no Teste do Labirinto Aquático..... | 31 |
| Figura 5: Resultado da abstinência ao EtOH crônico e intermitente sobre a aprendizagem de animais adolescentes e adultos, no teste da memória de curta duração do Labirinto Aquático..... | 35 |
| Figura 6: Resultado da abstinência ao EtOH crônico e intermitente sobre a aprendizagem de animais adolescentes e adultos, no teste da memória de longa duração do Labirinto Aquático..... | 37 |
| Figura 7: Resultado da abstinência ao EtOH crônico e intermitente sobre a flexibilidade cognitiva de animais adolescentes e adultos, no teste da memória de curta duração do Labirinto Aquático..... | 39 |
| Figura 8: Resultado da abstinência ao EtOH crônico e intermitente sobre a flexibilidade cognitiva de animais adolescentes e adultos, no teste da memória de longa duração do Labirinto Aquático..... | 41 |

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Quadro 1: Grupos experimentais27

Tabela 1: Análise das concentrações sanguíneas de etanol (BAC) 1 hora após o último ciclo de *binge drinking* durante a adolescência e fase adulta.....34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|-------------------------------|--|
| EtOH | Etanol |
| BD | Binge drinking |
| NIAAA | Instituto Nacional de Abuso de Álcool e Alcoolismo |
| ADH | Álcool desidrogenase |
| CYP2E1 | Enzimas microsossomais citocromo P450 2E1 |
| EROs | Espécies reativas de oxigênio |
| SNC | Sistema Nervoso Central |
| ACD | Acetaldeído |
| ALDH | Enzima aldeído desidrogenase |
| GABAA | Ácido γ -amino-butirico |
| Glu | Glutamato |
| NMDA | N-Metil-D-Aspartato |
| DPN | Dias pós-natais |
| BAC | <i>Blood alcohol concentration</i> |
| EAC | <i>Encephalon alcohol concentration</i> |
| H ₂ O _d | Água destilada |
| FTE | Fase de treinamento espacial |
| FTEE | Fase teste da exploração espacial |
| QA | Quadrante Alvo |
| FTR | Fase de treinamento da reversão |
| FTER | Fase teste da exploração de reversão |
| EDTA | Ácido etilenodiamino tetra-acético |
| LTP | <i>Long-term potentiation</i> |
| LTD | <i>Long-term depreciation</i> |
| 3 α ,5 α -THP | Alopregnanolona |
| BHE | Barreira hematoencefálica |

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 15 |
| 1.1. PREVALÊNCIA DO CONSUMO E PADRÃO DE INGESTÃO DO ETANOL | 15 |
| 1.2. FARMACOCINÉTICA DO ETANOL E VIAS DE METABOLIZAÇÃO..... | 16 |
| 1.3. FARMACODINÂMICA DO ETANOL E O MECANISMO DA HOMEOSTASE | 18 |
| 1.4. CONSUMO DE ETANOL ENTRE AS DIFERENTES FASES DO DESENVOLVIMENTO CEREBRAL | 19 |
| 1.5. CRONOLOGIA DA ADOLESCÊNCIA E ADULTEZ EM ROEDORES..... | 20 |
| 1.6. MATURAÇÃO CEREBRAL E A TOXICIDADE DO ETANOL..... | 21 |
| 2. OBJETIVOS..... | 24 |
| 2.1. OBJETIVO GERAL | 24 |
| 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 24 |
| 3. METODOLOGIA | 26 |
| 3.1. ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO | 26 |
| 3.2. GRUPOS EXPERIMENTAIS | 26 |
| 3.3. TRATAMENTO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS..... | 27 |
| 3.4. ENSAIOS COMPORTAMENTAIS | 28 |
| 3.4. TESTE DO LABIRINTO AQUÁTICO OU <i>WATER MAZE TEST</i> | 29 |
| 3.5. ESTATÍSTICA..... | 32 |
| 4. RESULTADOS..... | 34 |
| 4.1. A CONCENTRAÇÃO SANGUÍNEA DE ETANOL ATINGE VALORES QUE CARACTERIZAM EXPOSIÇÃO EM BINGE DRINKING 1 HORA APÓS A ADMINISTRAÇÃO DA DOSE DE 3G/KG/DIA..... | 34 |
| 4.2. EXPOSIÇÃO CRÔNICA E INTERMITENTE AO ETANOL NA ADOLESCÊNCIA E NA FASE ADULTA NÃO DEMONSTROU PREJUÍZO À APRENDIZAGEM ESPACIAL NOS PRIMEIROS DIAS DE ABSTINÊNCIA..... | 34 |

| | |
|--|-----------|
| 4.3. ETANOL EM BD PROVOCOU PREJUÍZOS SOBRE A FLEXIBILIDADE COGNITIVA EM UMA TAREFA ESPACIAL EM ANIMAIS ADULTOS, MAS NÃO EM ADOLESCENTES..... | 38 |
| 5. DISCUSSÃO | 43 |
| 6. CONCLUSÃO | 51 |
| 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS | 53 |
| 8. REFERÊNCIAS..... | 55 |
| 9.1. ANEXO A – PARECER DE AUTORIZAÇÃO DA COMISSÃO DE BIOÉTICA.. | 63 |
| 9.2. ANEXO B – ARTIGO PUBLICADO | 64 |

I. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. PREVALÊNCIA DO CONSUMO E PADRÃO DE INGESTÃO DO ETANOL

O hábito de ingerir etanol (EtOH) é iniciado e sustentado pela busca em atenuar estados afetivos negativos como, por exemplo, ansiedade, tensão e estresse, assim como, melhorar ou prolongar estados de relaxamento (YANG et al., 2014). Estas propriedades tornaram o EtOH a droga recreativa mais consumida globalmente (NOVIER et al., 2015), prática culturalmente favorecida por fatores como: custo reduzido, fácil acesso, e por consistir em uma droga lícita de ampla disponibilidade (JOHNSTON et al., 2009; OMS, 2014).

Devido ao alto impacto social e econômico gerados (CONTRERAS et al., 2017), o consumo abusivo desta substância tornou-se um grave problema de saúde pública (INPAD, 2013), associado a uma carga elevada de morbidades como câncer, cirrose e distúrbios mentais e comportamentais (COMELLI et al., 2018), além de elevados índices de mortalidade, com cerca de 3,3 milhões de mortes por ano no mundo (OMS, 2014).

Os efeitos nocivos do álcool são determinados pela quantidade, período e frequência do consumo (ZEIGLER et al., 2005; YANG et al., 2014). Conceitualmente, o padrão de ingestão é classificado por pesado, moderado ou leve, e pode ser contínuo ou intermitente, bem como pode ocorrer nas formas aguda ou crônica (NIAAA, 2004; OMS, 2014).

Durante muitos anos, o EtOH assumiu dentro da sociedade um padrão de ingestão contínuo e crônico em altas doses, conhecido como “*heavy drinking*” (NIAAA, 2016). Porém, o padrão de consumo intermitente e episódico, conhecido como “*binge drinking*” (BD) é, atualmente, a forma de ingestão do etanol mais comum, principalmente entre os adolescentes menores de idade e adultos jovens (aproximadamente 90% dos casos) [HOSOVIÁ & SPEAR, 2017; LEE et al., 2017].

BD é o consumo de altas doses de EtOH em um curto período de tempo (5 ou mais doses/ 2 horas para homens; 4 ou mais doses/ 2 horas para mulheres) [SPEAR, 2018], realizado em grupos com frequência de três dias, principalmente nas noites do fim de semana (PARADA et al., 2011), seguido por um período de abstinência, continuamente repetida ao longo dos dias (PETIT et al., 2013; TAPIA-ROJAS et al., 2017).

Esta forma de consumo é caracterizada pelo Instituto Nacional de Abuso de Álcool e Alcoolismo (NIAAA) por atingir altas concentrações de EtOH no sangue ($\geq 80\text{mg/dL}$ ou $0,08\text{g/dL}$) em um período de tempo de até duas horas (HOSOVA & SPEAR, 2017; TAPIA-ROJAS et al., 2017). Esses níveis são tipicamente atingidos em homens que consomem cinco bebidas ou mais e em mulheres pelo consumo de quatro bebidas ou mais (NIAAA, 2004; HOSOVA & SPEAR, 2017).

A ingestão episódica e intermitente de álcool tem sido relacionada a danos cerebrais e déficits cognitivos em qualquer fase da vida (ORIO et al., 2017), bem como a incidência de efeitos negativos em longo prazo, incluindo problemas mentais (SANCHEZ-MARIN et al., 2017). Além disto, também tem sido associada ao “gatilho” para o uso de outras drogas e um fator potencialmente decisivo na progressão do vício em direção à dependência de álcool na vida adulta (TAPIA-ROJAS et al., 2017; CONTRERAS et al., 2017; FRITZ et al., 2015; SPEAR, 2018).

1.2. FARMACOCINÉTICA DO ETANOL E VIAS DE METABOLIZAÇÃO

A farmacocinética do EtOH é o fator determinante da concentração e do tempo de permanência desta substância na circulação sanguínea, além do grau de exposição dos órgãos aos seus efeitos (RAMCHANDANI e BOSRON, 2001).

Após a ingestão oral, o álcool é quase completamente absorvido, principalmente pelo intestino delgado por difusão passiva e, se ingerido com o estômago vazio, é ainda mais rapidamente absorvido, atingindo concentrações máximas entre 30 a 90 minutos (RAMCHANDANI e BOSRON, 2001).

O baixo peso molecular e alta solubilidade em água são características que conferem ao EtOH ampla difusão pelos tecidos (GOULLÉ & GUERBET, 2015). Desta forma, a distribuição e a concentração desta substância no organismo são dependentes do teor de água corpóreo, que em mulheres costuma ser proporcionalmente menor que nos homens, devido à maior quantidade de tecido adiposo, contribuindo com o aumento da concentração e maior pico de álcool no sangue para gênero feminino (CEDERBAUM, 2012).

Além disto, esta droga também parece afetar de forma desigual animais em diferentes fases da vida (NOVIER et al., 2015). Experiências tem demonstrado que os efeitos desta substância relacionados à idade dependem, principalmente, das variações

hormonais, neuronais e no sistema de neurotransmissores de cada fase do desenvolvimento (WALKER e EHLERS, 2009; NOVIER et al., 2015).

Em torno de 90% do metabolismo do EtOH ocorre majoritariamente no fígado (CISA, 2016), isto porque, neste órgão, encontram-se os principais sistemas enzimáticos de metabolismo periférico, responsáveis pela oxidação desta molécula, como a enzima álcool desidrogenase (ADH) e as enzimas microsossomais citocromo P450 2E1 (CYP2E1) [PEANA et al., 2016; CEDERBAUM, 2012].

Além destas vias oxidativas, a catalase, uma heme-enzima presente nos peroxissomos das células, também atua contribuindo no metabolismo do EtOH no Sistema Nervoso Central (SNC), resultando em um dos mecanismos de dano celular provocado por esta droga, devido ao aumento da formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) nesta região (VONGHIA et al., 2008; CEDERBAUM, 2012).

Em qualquer das vias metabólicas do etanol, periférica ou central, o produto da reação é o acetaldeído (ACD). Em seguida, a enzima aldeído desidrogenase (ALDH) converte o ACD em acetato, que finalmente é excretado do organismo (Figura 1; PEANA et al., 2016; CISA, 2016).

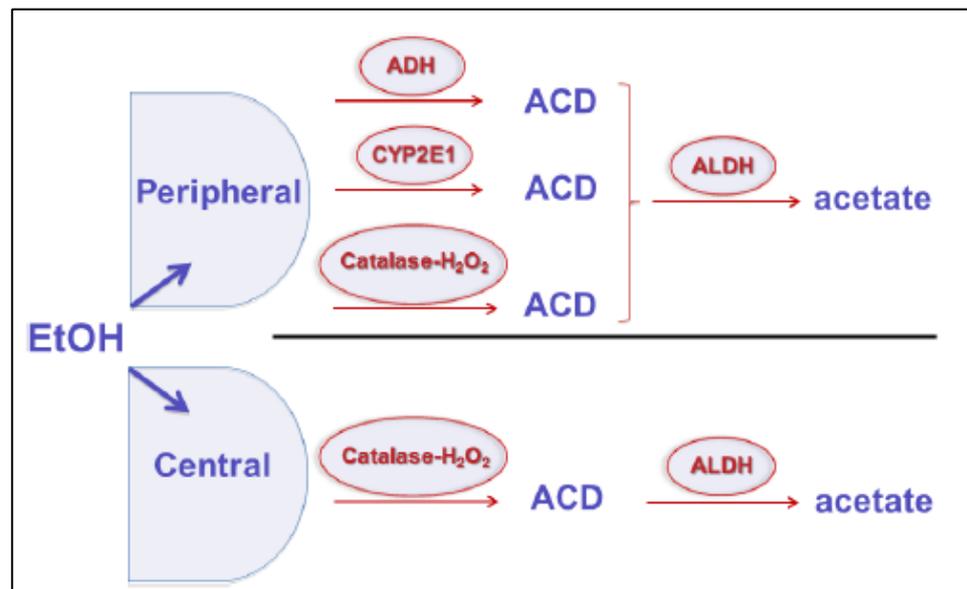


Figura 1: Vias metabólicas do etanol resultando na formação de acetato (PEANA et al., 2016).

O mecanismo pelo qual a resposta ao EtOH em animais adolescentes e adultos pode vir a ser desigual, segue a hipótese farmacocinética desta substância no

organismo. De fato, alguns estudos consideram que o metabolismo do álcool pode variar com a idade (WALKER & EHLERS, 2009) e outros estudos relatam farmacocinética comparável desta droga em roedores em diferentes fases da vida (SPEAR, 2000).

Segundo Cederbaum (2012), os animais jovens têm baixas taxas de eliminação de álcool devido às enzimas ADH e CYP2E1 não estarem totalmente expressas nesta fase da vida. Além disto, durante o envelhecimento também pode haver um pequeno declínio na eliminação do álcool, provavelmente pela diminuição da massa hepática ou pela redução fisiológica do teor de água corporal.

1.3. FARMACODINÂMICA DO ETANOL E O MECANISMO DA HOMEOSTASE

Por ser o principal agente psicofarmacologicamente ativo das bebidas alcoólicas, o EtOH foi reconhecido como o responsável pelos transtornos relacionados ao consumo do álcool, como patologias cardiovasculares e relacionadas ao fígado, assim como desordens neurológicas e déficits cognitivos (PEANA et al., 2016; MATTHEWS & MITTLEMAN, 2017).

O principal alvo do EtOH no cérebro é o neurotransmissor inibitório conhecido como Ácido γ -amino-butirico (GABAA). Por meio do aumento da atividade dos receptores de GABAA, esta substância facilita a condução da corrente inibitória em diversas regiões do SNC. Além disto, outro importante alvo central do EtOH são os receptores de glutamato (Glu) do tipo N-Metil-D-Aspartato (NMDA), pelos quais a droga inibe as correntes excitatórias mediadas por estes receptores (PEANA et al., 2016).

Desta forma, o consumo de EtOH provoca a depressão do SNC pela alteração das vias inibitórias (aumento da atividade de receptores GABAérgicos) e excitatórias (redução da atividade dos receptores glutamatérgicos).

O hábito contínuo de ingestão desta droga gera alterações neurobiológicas que atuam na tentativa de recuperar o estado de excitabilidade “normal” do cérebro, resultando na supressão da expressão dos receptores GABAérgicos, conhecido como “*down-regulation*”, bastante envolvido nos mecanismos de tolerância ao EtOH (ALELE & DEVAUD, 2005).

Além disto, principalmente durante a síndrome de abstinência, desencadeia-se o fenômeno da hiperatividade de rebote, devido à intensa ativação dos receptores glutamatérgicos em um processo conhecido como “*up-regulation*”, que em mulheres parece ocasionar consequências fisiológicas mais nocivas e mais rápidas do que nos

homens, apesar de apresentarem sintomatologia de abstinência reduzida em comparação ao sexo oposto (ALELE & DEVAUD, 2005).

Além destes mecanismos, o EtOH atua indiretamente no aumento da atividade dos receptores dopaminérgicos do tipo D1 e D2, além de serotoninérgicos (PEANA et al., 2016; ALELE & DEVAUD, 2005), e a somatória destes eventos moleculares é responsável pelos efeitos neurocomportamentais típicos do consumo desta droga, como a desinibição e a atividade sedativo-hipnótica (KUMAR et al., 2009).

1.4. CONSUMO DE ETANOL ENTRE AS DIFERENTES FASES DO DESENVOLVIMENTO CEREBRAL

O hábito de ingerir bebidas alcoólicas tem se tornado mais frequente entre os adolescentes de baixa idade e o contexto social tem contribuído criticamente neste processo (SPEAR, 2018).

Resultados mais recentes da Pesquisa Nacional sobre Uso de Drogas e Saúde (2013) relataram que de nove adolescentes nas idades de 12 a 17 anos, um era consumidor atual de álcool, e que nesta fase da vida houve um aumento da inserção das mulheres em relação aos homens nesta prática (12,3% e 10,8%, respectivamente) [SAMHSA, 2014; HOSOVA & SPEAR, 2017].

Além disto, dos usuários de álcool entre 10 a 20 anos, aproximadamente 60% relataram consumir pelo menos cinco bebidas na mesma ocasião, e um a cada sete, realiza cinco ou mais episódios de BD (HOSOVA & SPEAR, 2017).

A frequência de consumo do EtOH na adolescência pode estar relacionada às alterações durante a maturação cerebral, como a redução dos níveis dopaminérgicos e serotoninérgicos, resultando em mudanças de humor e aumento da dificuldade de controlar emoções e impulsos (ARAIN et al., 2013).

Estas alterações fisiológicas podem exigir níveis mais elevados de estimulação dopaminérgica para alcançar os mesmos níveis de prazer e recompensa, levando os adolescentes a tomada de decisões arriscadas (ARAIN et al., 2013). Isto pode estar relacionado com o aumento do comportamento de impulsividade, além da busca de sensações e novidades dos adolescentes em comparação com os adultos (LEE et al., 2017), o que favorece o envolvimento em comportamentos de risco, como a experimentação de drogas, sendo o álcool a substância mais elegida por este grupo etário (SPEAR, 2014; LEE et al., 2017).

Em contrapartida ao período da adolescência, a proporção de bebedores de álcool em adultos jovens de 18 a 25 anos tem aumentado (aproximadamente 61% são homens e 57% são mulheres), e as taxas mais elevadas de comportamento compulsivo pela droga (37,7%) foram observadas justamente neste intervalo de idade entre os adultos jovens (HASOVA & SPEAR, 2017).

1.5. CRONOLOGIA DA ADOLESCÊNCIA E ADULTEZ EM ROEDORES.

A exatidão do período da adolescência em roedores ainda necessita de um consenso e tem sido definida com base nos fatores indicativos de transição do desenvolvimento de adolescentes humanos, como mudanças nos padrões de comportamento, padrões hormonais e/ou características sexuais primárias (MALDONADO-DEVINCCI et al., 2010).

O intenso neurodesenvolvimento característico desta fase da vida ocorre, em humanos, entre as idades de aproximadamente 11-21 anos, correspondente ao período de vida de 28-42 dias pós-natais (DPN) em roedores (LEE et al., 2017; SPEAR, 2014), em que também se iniciam as mudanças comportamentais nos animais mais jovens em relação aos mais velhos, associadas a picos no crescimento corpóreo (SPEAR, 2000), além da especialização das redes neurais do córtex pré-frontal (SEMPLE et al., 2013).

Após a separação da mãe no 21º DPN (desmame), inicia-se o processo de maturação sexual, definida pela abertura vaginal (fêmeas) ou separação balanoprepucial (machos), respectivamente alcançada em aproximadamente 32-34 e 45-48 DPN (SENGUPTA, 2013).

Adicionalmente, alguns pesquisadores têm identificado às categorias da adolescência em roedores como precoce (pré-púberes: 21-34 DPN), média (periadolescência: 34-46 DPN) e tardia (adulto jovem: 46-59 DPN) [TIRELLIA et al., 2003; MALDONADO-DEVINCCI et al., 2010].

Com base nisto, a faixa etária entre os dias 28 e 50 DPN tem sido escolhida com mais frequência para representar o período da adolescência em ratos (ACHESON et al., 2013), e a etapa de transição para a idade adulta se inicia após a oitava semana pós-natal, em torno do 63º DPN (SENGUPTA, 2013), com plenitude da adultez a partir de 70 DPN (KARL et al., 2003; ACEVEDO et al., 2013; ACHESON et al., 2013).

1.6. MATURAÇÃO CEREBRAL E A TOXICIDADE DO ETANOL

Durante o período da vida que compreende a adolescência, alterações fisiológicas significativamente dramáticas ocorrem no cérebro, incluindo mudanças regressivas, como o processo de podas neuronais (refinamento sináptico) e modificações progressivas como, por exemplo, a mielinização axonal, favorecendo a interligação de regiões cerebrais, além do aperfeiçoamento do sistema de sinalização dos neurotransmissores (SPEAR, 2014).

Nesta fase, o processo de maturação do cérebro também é acompanhado por modificações estruturais específicas de cada região, como hipocampo, córtex pré-frontal e o sistema límbico (TAPIA-ROJAS et al., 2017). Desta forma, a adolescência é um período de crítico desenvolvimento cerebral, com ampla maturação emocional, social e cognitiva (AMODEO et al., 2017).

A plasticidade sináptica na região do hipocampo, característico desta fase da vida, desempenha um papel essencial sobre a memória, assim como sobre os processos de aprendizagem e flexibilidade cognitiva (ZHANG et al., 2017). O hipocampo é fundamental para aquisição da memória dentro do contexto espacial, e o córtex pré-frontal interage com o hipocampo dando suporte ao controle cognitivo e suprimindo memórias inapropriadas neste mesmo contexto, a fim de contribuir na aquisição de novas memórias (PLACE et al., 2016).

A disfunção cognitiva pode estar associada, além da condição congênita, a fatores ambientais como toxicidade e lesões cerebrais (PURI et al., 2014), ou por fatores fisiológicos como estresse, inflamação e problemas neurológicos (HAIDER et al., 2016).

Sabe-se que o consumo do EtOH resulta em supressão da taxa de disparos de neurônios piramidais do hipocampo e antagoniza os receptores do tipo NMDA (HUNT e BARNET, 2016), fatores sugestivos dos efeitos prejudiciais desta droga na habilidade da aprendizagem e memória mediadas pela região hipocampal (HUNT & BARNET, 2016; OBAD et al., 2018), além dos prejuízos à atenção e às funções executivas (MCCLINTICKA et al., 2016).

Desta forma, como a adolescência é uma etapa de intensa neuroplasticidade e neurogênese (VETRENO e CREWS, 2015), é provável que o cérebro adolescente possa ser mais vulnerável aos efeitos nocivos do consumo excessivo de álcool em comparação ao cérebro adulto maduro, podendo acarretar em déficits comportamentais relacionados

à memória, comportamento semelhante à ansiedade e prejuízos motores (GUERRI & PASCUAL, 2010).

As alterações específicas de cada região do cérebro, como lobo frontal e hipocampo, continuam até o início da vida adulta, em adultos jovens. Tanto estas regiões quanto as funções associadas a elas, são as últimas a atingirem o desenvolvimento completo durante a maturação cerebral. Além disto, estas regiões são as primeiras a sofrerem o processo de degeneração durante o envelhecimento, e ambas são particularmente suscetíveis às consequências negativas do consumo de álcool (SILVERI, 2014).

Com base nisto, é possível que a exposição ao etanol possa causar prejuízos ao funcionamento cerebral não apenas durante o período de intensa maturação e desenvolvimento, mas também quando associado à processos neurodegenerativos fisiológicos do envelhecimento, porém, não está claro se os efeitos sobre o processo mnemônico gerados pelo EtOH podem estar relacionados ao declínio cognitivo naturalmente observado neste etapa da vida (SPEAR, 2018).

Devido ao aumento dos transtornos relacionados ao consumo de EtOH em fases da vida pós-adolescência (MATTHEWS & MITTLEMAN, 2017), tem-se ampliado os estudos sobre alterações cognitivas e neurobiológicas desta droga nos estágios finais do processo de maturação cerebral (BENNETT & BAIRD, 2006), em indivíduos funcionalmente mais independentes que os adolescentes (SILVERI, 2014), e nesta população, o abuso e dependência do EtOH estão associados a alterações estruturais e funcionais do cérebro, particularmente em redes frontais e no hipocampo (SILVERI, 2014).

De fato, devido às diferenças neuroanatômicas e neurofisiológicas do SNC, principalmente na região hipocampal, faz-se importante investigar se o EtOH produz, de forma semelhante, prejuízos sobre a aprendizagem e flexibilidade cognitiva em diferentes etapas do desenvolvimento cerebral (CHIN et al., 2010).

II. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar se a aprendizagem espacial e a flexibilidade cognitiva são igualmente afetadas em diferentes etapas da maturação cerebral após exposição ao EtOH em BD em ratas.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a concentração sanguínea de EtOH plasmático no tempo de até duas horas após a administração da droga;
- Avaliar aprendizagem espacial no Teste do Labirinto Aquático após exposição ao EtOH em BD na adolescência;
- Avaliar a flexibilidade cognitiva no Teste do Labirinto Aquático após exposição ao EtOH em BD na adolescência;
- Avaliar aprendizagem espacial no Teste do Labirinto Aquático após exposição ao EtOH em BD na adultez;
- Avaliar a flexibilidade cognitiva no Teste do Labirinto Aquático após exposição ao EtOH em BD na adultez.

III. METODOLOGIA

3. METODOLOGIA

3.1. ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO

Primeiramente, este estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa com Animais e Experimentação da Universidade Federal do Pará (CEPAE-UFPA), aprovado sob o número CEUA nº 4372131017, e obedece 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).

Neste trabalho foram utilizados ratos *Wistar*, fêmeas (n=56), provenientes do Biotério da Universidade Federal do Pará (UFPA), mantidos no Biotério da Faculdade de Farmácia em condições padronizadas de temperatura, exatidão, ciclo de luz claro/escuro de 12 horas (luz acesa às 07:00 hs) a fim de não interferir no ciclo circadiano dos animais, água e comida *ad libitum*. Além disto, os animais foram mantidos em caixas próprias, em grupos de 5 – 6 animais, para evitar o estresse por isolamento.

3.2. GRUPOS EXPERIMENTAIS

Inicialmente, dos animais envolvidos neste estudo, 28 animais eram adolescentes e foram subdivididos em Grupo Controle (n=10) e Grupo Etanol (n=18), assim como, da mesma forma, para 28 animais adultos. No grupo EtOH, 12 animais foram destinados aos ensaios comportamentais das atividades cognitivas, enquanto que, outros 6 animais foram destinados apenas à dosagem do EtOH na corrente sanguínea (BAC). A distribuição dos grupos experimentais está representada no quadro abaixo [Quadro 1].

| GRUPOS ETÁRIOS | IDADE | GRUPOS EXPERIMENTAIS | NÚMERO |
|-------------------------------|-------------------|----------------------|--------|
| ADOLESCENTES (n=28) | 28 – 51DPN | CONTROLE (BD) | 10 |
| | | ETANOL (BD) | 12 |
| | | ETANOL (BAC) | 06 |
| ADULTOS (n=28) | 68 – 91DPN | CONTROLE (BD) | 10 |
| | | ETANOL (BD) | 12 |
| | | ETANOL (BAC) | 06 |

Quadro 1: Grupos experimentais

3.3. TRATAMENTO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

As administrações foram realizadas por via oral (gavagem), através de cânula orogástrica e consistiram em água destilada (H₂O_d.) para os grupos controles e EtOH (Nuclear, Brasil) para os grupos EtOH, na dose de 3 g/kg/dia (20 p/v) (NOGALES et al.,

2014; TORCASO et al., 2017; SANCHEZ-MARIN et al., 2017). As doses de H₂O_d/EtOH foram semanalmente ajustadas de acordo com o peso dos animais.

O tratamento ocorreu semanalmente por três dias consecutivos, seguidos de quatro dias sem nenhuma administração, do 28º até 51º DPN, período que compreende a adolescência, da fase precoce até o adulto-jovem (TIRELLI et al., 2003; MALDONADO-DEVINCCI et al., 2010) e, de forma equivalente, para os animais na idade adulta, iniciando-se o tratamento no 68º DPN e estendendo-se até o 91º dia de vida dos animais (KARL et al., 2003; ACEVEDO et al., 2013). A figura 2 representa o esquema de intoxicação intermitente e episódico nas duas faixas etárias avaliadas.

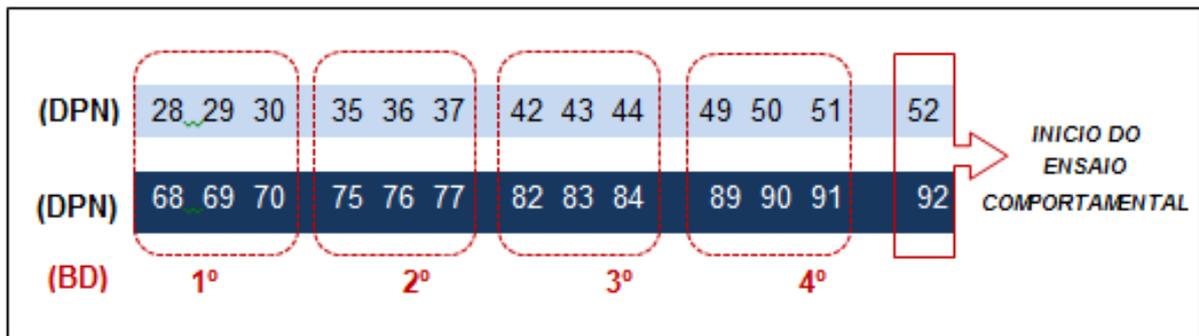


Figura 2: Esquema do tratamento em *binge drinking* de etanol (3g/kg/dia) e água destilada, em animais adolescentes e adultos, com início dos testes comportamentais 24 horas após a última administração de doses.

3.4. ENSAIOS COMPORTAMENTAIS

De acordo com trabalhos anteriormente realizados, a concentração sanguínea de EtOH em ratos, administrado por gavagem, possui um declínio gradual e dura em torno de 450 minutos (7,5 horas) para ser eliminado do organismo (LIVY et al., 2003). Ao fim do último ciclo de BD, 24 horas após a última administração de H₂O_d/EtOH, foi iniciado a investigação da função cognitiva dos grupos etários. Desta forma, os animais foram submetidos aos ensaios comportamentais quando não mais havia concentrações circulantes desta droga no organismo, ou seja, no período de abstinência.

Os ensaios comportamentais foram realizados no Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Comportamento, da Faculdade de Farmácia/UFPa. Anterior ao início da avaliação da atividade cognitiva, os animais foram conduzidos à sala de teste por um período de uma hora para aclimação e habituação ao ambiente de realização dos

ensaios, que consistiu em uma sala própria, com atenuação dos níveis de ruído e baixa intensidade de iluminação (12 lx).

3.4. TESTE DO LABIRINTO AQUÁTICO OU WATER MAZE TEST.

Animais adolescentes e adultos (n= 22/grupo), previamente expostos a repetidos e episódicos ciclos de H₂O_d e EtOH, foram avaliados quanto a capacidade de aprender uma tarefa não visual (espacial), assim como, quando submetidos a uma nova atividade espacialmente diferente da anterior, a capacidade de reaprendê-la no novo formato.

Os parâmetros de aprendizagem espacial, bem como de aprendizagem de uma nova atividade (flexibilidade cognitiva), foram avaliados, respectivamente, segundo o teste da plataforma submersa e da troca de posição desta plataforma no Teste do Labirinto Aquático (TLA).

Este teste consistiu em um tanque circular sob as medidas de 150 cm de diâmetro e 60 cm de altura total, preenchido por água e corante azul não tóxico a altura de 45 cm e temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Duas linhas perpendiculares foram utilizadas para divisão deste aparato ao meio, formando quatro quadrantes iguais, enumerados por I (iniciando à esquerda da posição Norte), II, III e IV. Além disto, foi colocado no interior do tanque, uma plataforma quadrada possuindo 10cm^2 de diâmetro e 43cm de altura, submersa 2cm abaixo d'água.

O protocolo adotado para realização deste teste seguiu o modelo utilizado por Silva e colaboradores (2015), sob algumas modificações.

Para investigação da aprendizagem espacial, cada animal foi exposto a duas etapas de avaliação, divididas em Fase de Treinamento e Fase Teste. A fase de treinamento ocorreu vinte e quatro horas após a última administração de EtOH/H₂O_d em uma etapa onde cada animal foi exposto uma vez em cada quadrante do tanque com teto máximo de tempo de 60 segundos para encontrar a plataforma submersa no quadrante II (à direita do ponto Norte).

A posição inicial de partida dos animais foi escolhida aleatoriamente e seguiu a sequência: 1º) Quadrante III; 2º) Quadrante IV; 3º) Quadrante I e 4º) Quadrante II – quadrante no qual a plataforma permaneceu durante toda a fase de treinamento –, portanto chamado Quadrante Alvo (QA) [Figura 3].

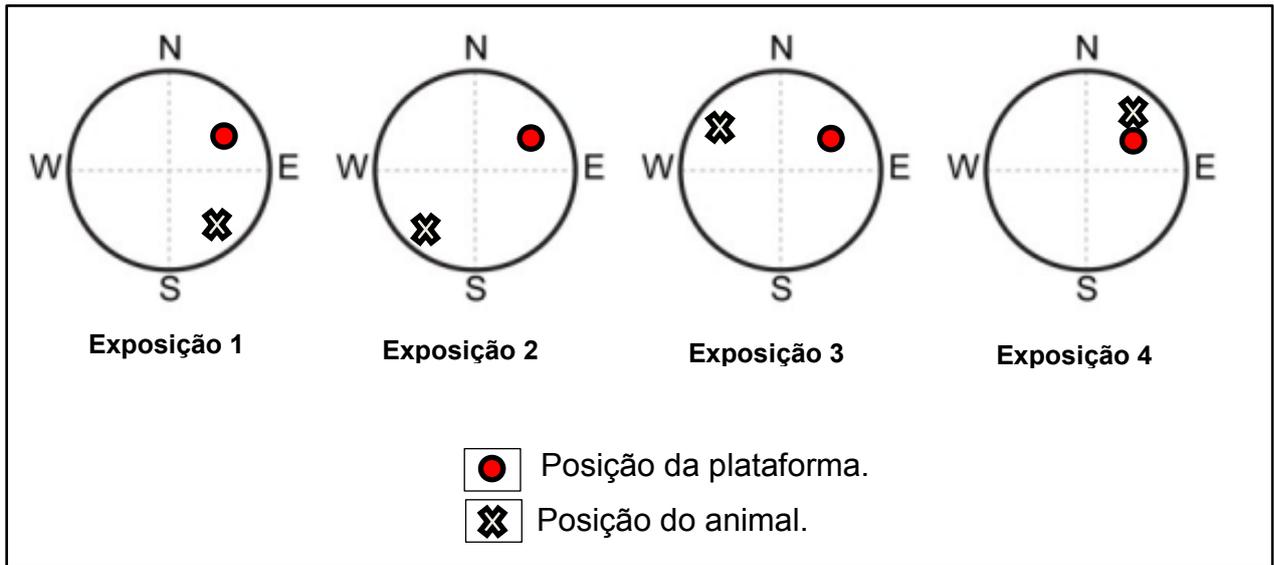


Figura 3: Desenho esquemático da Fase de Treinamento Espacial do Teste do Labirinto Aquático.

Cada vez que o animal em treinamento for capaz de encontrar a plataforma no limite de tempo de 60 segundos, foi então mantido por 10 segundos sobre a mesma, até o reinício da próxima exposição, com partida inicial em outro quadrante. No caso de o animal fracassar em encontrar a plataforma, foi direcionado delicadamente até a mesma, onde permaneceu por dez segundos até o início da próxima exposição.

Após trinta minutos da fase de treinamento, os animais foram submetidos à fase teste da aprendizagem da memória de curta duração. Na etapa teste, foi analisado a 1) Latência de Escape, ou seja, o tempo que cada animal levou para encontrar a plataforma submersa após a fase de treinamento, como indicador da qualidade da aprendizagem espacial.

Vinte e quatro horas após a avaliação da aprendizagem na fase teste da memória de curta duração, cada animal foi exposto à avaliação da aprendizagem espacial da memória de longa duração. Nesta etapa, a plataforma foi retirada do tanque e, como posição inicial, os animais foram colocados com a face virada para o ponto Sul do aparato; o período de avaliação compreendeu o tempo de 60 segundos. Nesta etapa, os parâmetros de análise foram 1) Latência de Entrada no QA; 2) Tempo no QA e 3) N° de Entradas no QA, como parâmetros da qualidade da memória de longa duração da aprendizagem espacial.

A investigação da flexibilidade cognitiva teve início vinte e quatro horas após a fase teste da memória de longa duração da aprendizagem, e também compreendeu uma fase de treinamento, uma fase teste da memória de curta duração e, uma fase teste da

memória de longa duração da flexibilidade cognitiva. Esta etapas, no geral, ocorreram de forma semelhante à etapas da aprendizagem espacial, com a diferença da posição da plataforma submersa dentro do tanque, que foi realocada para o quadrante oposto, neste caso, o quadrante III, que passou a ser o QA desta fase.

As posições de início dos animais foram 1) Quadrante II; 2) Quadrante I; 3) Quadrante IV e 4) Quadrante III – quadrante no qual a plataforma permaneceu durante toda a etapa treino – portanto chamado QA (Figura 4).

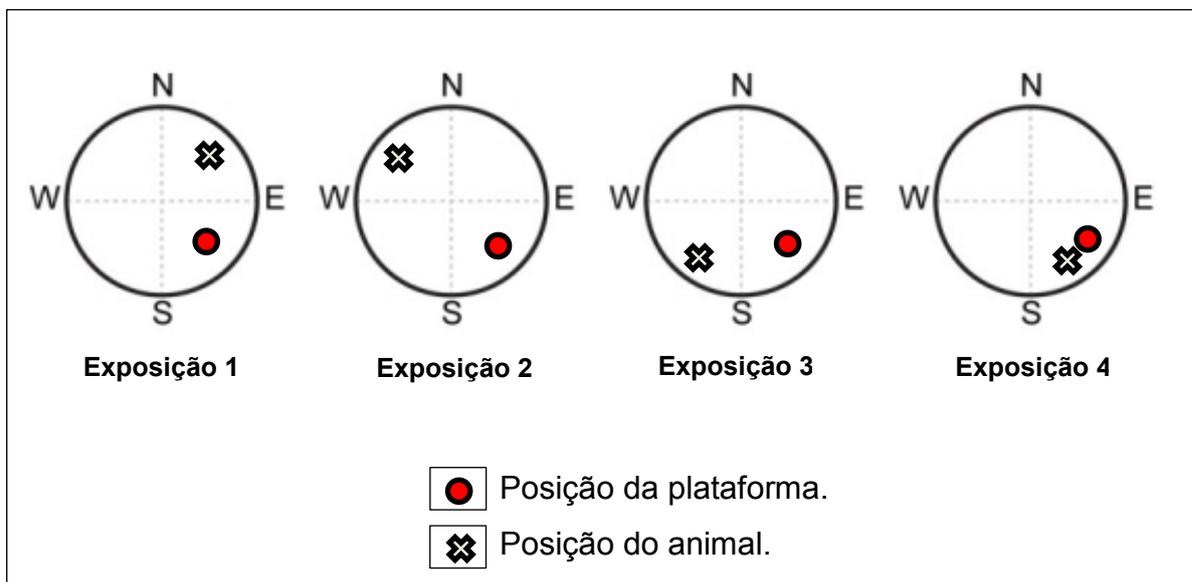


Figura 4: Desenho esquemático da Fase de Treinamento da Reversão do Teste do Labirinto Aquático.

Novamente, trinta minutos após a fase de treino, os animais foram avaliados quanto à memória de curta duração da flexibilidade cognitiva, da mesma forma como, vinte e quatro horas após, foram avaliados na memória de longa duração da flexibilidade, investigando-se capacidade em aprender uma nova atividade espacial.

3.5. ANÁLISE DAS CONCENTRAÇÕES DE ETANOL NO SANGUE OU BLOOD ALCOHOL CONCENTRATION (BAC)

A alcoolemia foi avaliada em animais que não foram expostos aos ensaios comportamentais, mas seguiram o mesmo tempo de tratamento com EtOH em BD durante a adolescência e durante a adultez (n=6 animais/grupo). Segundo Livy e

colaboradores (2003), a concentração alcoólica é um importante parâmetro indicativo e certificador da exposição ao padrão de consumo em BD.

Após o protocolo administração intermitente e episódica (3 dias *on*/4 dias *off*) de EtOH (3 g/kg/dia) no padrão BD durante adolescência e a fase adulta, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e as amostras de sangue foram coletadas por via intracardíaca sessenta minutos após a última administração do EtOH, transferidas para tubos contendo anticoagulante ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e, em seguida, armazenadas a -20°C até que a concentração da alcoolemia fosse mensurada.

Resumidamente, o sangue homogeneizado (500 µL) foi adicionado ao butanol como padrão interno (500 µL) 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 × 0,25 µm de espessura do filme. A temperatura do detector foi de 250°C e a do injetor de 200°C.

3.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram expressos como média ± erro padrão da média (e.p.m.) de 10 - 12 animais por grupo para os testes comportamentais e de 6 animais para a análise bioquímica.

Os valores de cada parâmetro analisado foram submetidos à curva gaussiana pelo método de Kolmogorov-Smirnov, para avaliação da normalidade dos dados.

Diante de valores homogêneos obtidos na análise quantitativa do BAC, foi aplicado o Teste t-Student para avaliação estatística destes dados.

Para a avaliação estatística das fases de treinamento da aprendizagem espacial e flexibilidade cognitiva foi aplicado Análise de Variância (ANOVA) de Uma Via seguida pelo pós-teste Tukey e para as fases testes, da mesma forma que o BAC, a análise estatística foi realizada pelo teste estatístico *t de Student*.

Em todos os casos, o nível de significância aceito foi de $p \leq 0,05$.

IV. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1.A CONCENTRAÇÃO SANGUÍNEA DE ETANOL NA DOSE DE 3G/KG/DIA ATINGE VALORES QUE CARACTERIZAM EXPOSIÇÃO EM BINGE DRINKING 1 HORA APÓS A ADMINISTRAÇÃO.

Em relação às análises quantitativas no sangue, foi observado que 1 hora após a última administração crônica e intermitente de EtOH na adolescência e na idade adulta, os níveis sanguíneos foram consideravelmente superiores àqueles preconizados pelo NIAAA e que caracterizam o padrão BD de alcoolemia, como demonstrado na tabela abaixo:

| Local de Coleta | Período | Concentração EtOH (mg/dl) |
|-----------------|--------------|---------------------------|
| SANGUE | ADOLESCENCIA | 177.8 ± 5.5 |
| | ADULTEZ | 196.7 ± 4.8 |

Tabela 1: Análise das concentrações sanguíneas e EtOH (BAC) após quatro ciclos de binge drinking durante a adolescência e durante a vida adulta. As coletas foram realizadas 1 hora após a última administração de EtOH e os dados foram expressos como a média ± e.p.m de 6 animais.

4.2. EXPOSIÇÃO CRÔNICA E INTERMITENTE AO ETANOL NA ADOLESCÊNCIA E NA FASE ADULTA NÃO DEMONSTROU PREJUÍZO À APRENDIZAGEM ESPACIAL NOS PRIMEIROS DIAS DE ABSTINÊNCIA.

No tempo de vinte e quatro horas após exposição ao EtOH no padrão BD, no período que compreende à abstinência da droga, cada animal foi submetido a etapa treino. Trinta minutos após a sessão de treino, todos os animais foram submetidos à primeira etapa teste da aprendizagem espacial no TLA, objetivando investigar a atividade cognitiva imediata, identificada como memória de curta duração (MCD) ou curto alcance.

Na avaliação da MCD, a exposição ao EtOH crônico intermitente na adolescência e na fase adulta não demonstrou gerar prejuízo ao aprendizado espacial dependente de hipocampo. Na fase teste da aprendizagem espacial da memória de curta duração os

animais do grupo etanol, de forma semelhante aos animais do grupo controle, demonstraram redução do tempo para encontrar a plataforma submersa (tempo de latência) [Figura 5].

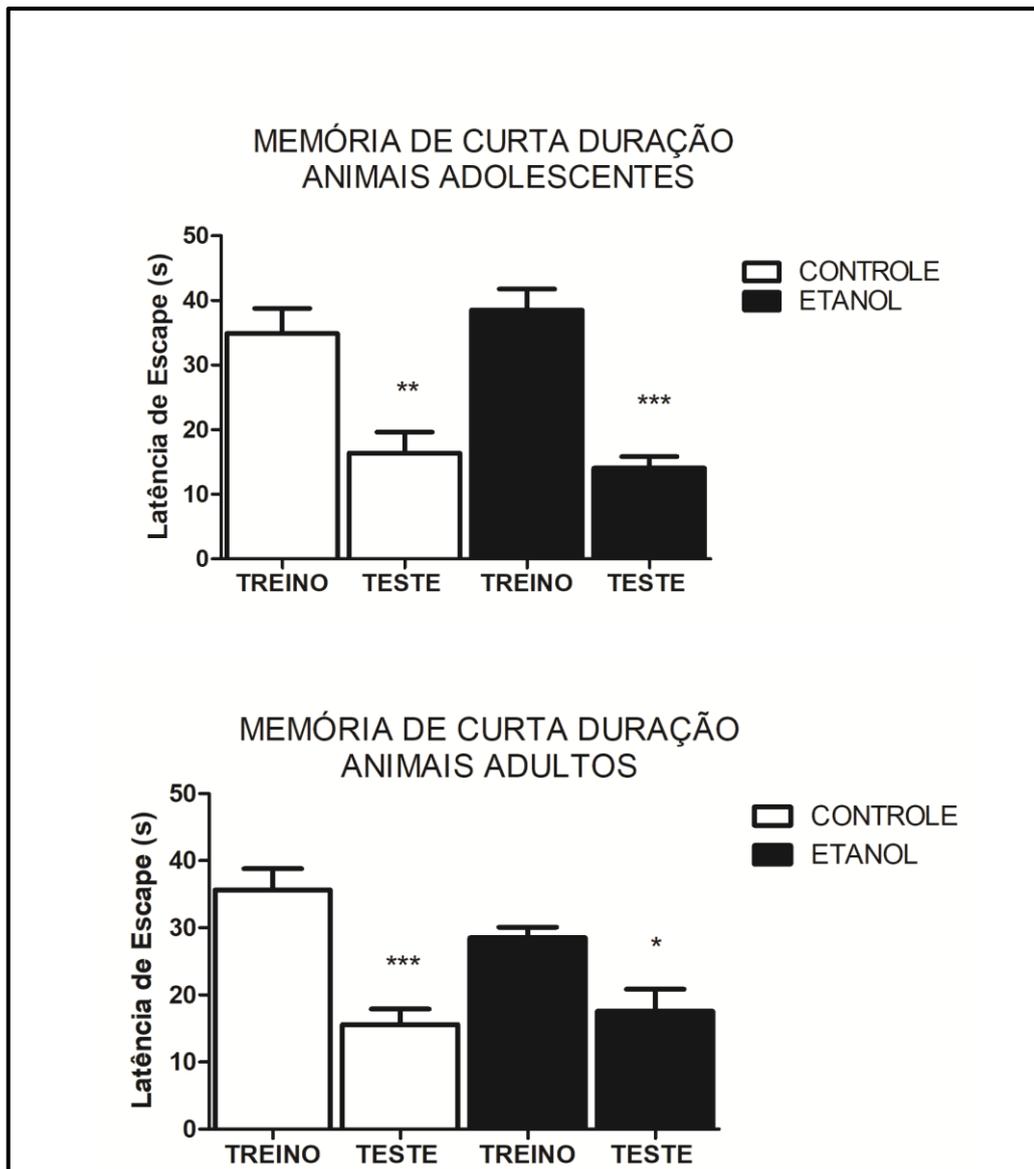


Figura 5: Tempo (s) despendido pelos animais dos grupos Controle/EtOH adolescentes e adultos até encontrar a plataforma submersa no QA do tanque durante a fase teste da aprendizagem na memória de curta duração, 30 minutos após a etapa treino. Animais adolescentes e adultos expostos a H₂O_d/EtOH demonstraram redução significativa do tempo de latência de escape ($p > 0,05$) na fase teste em relação a etapa treino. Resultados expressos como a média \pm e.p.m. de 10-12 animais por grupo, análise dos dados por ANOVA de uma via seguida do teste Tukey.

Da mesma forma, animais adolescentes e adultos expostos à 3BD de EtOH quando comparados aos animais expostos apenas à H₂O, não demonstraram prejuízos sobre a aprendizagem espacial quando avaliados no teste da memória de longa duração (MLD), realizado vinte e quatro horas após a etapa treino. Em análise dos resultados da MLD, após retirada da plataforma submersa, os animais dos grupos EtOH (adolescentes e adultos) não apresentaram diferenças significativas nos parâmetros avaliados em relação aos animais do grupo controle, exceto o aumento do tempo de permanência no quadrante alvo, que pode estar relacionado à prejuízos motores encontrados neste estudo durante a abstinência ao EtOH em BD, mas que será alvo de novos trabalhos posteriormente (Figura 6).

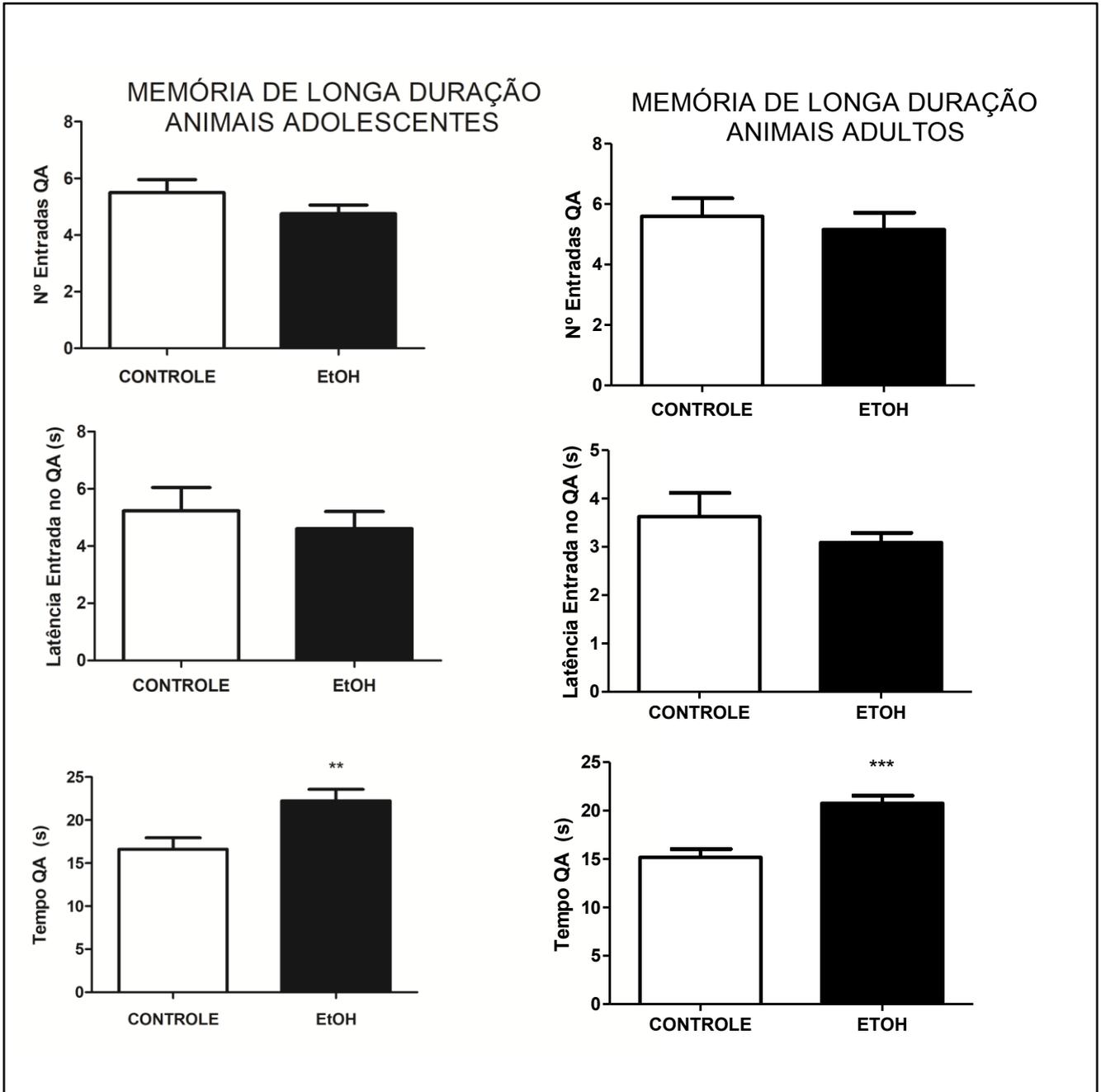


Figure 6: Fase teste da aprendizagem espacial de longa duração, 24h após a etapa de treinamento. A retirada do EtOH no padrão BD de consumo durante adolescência e fase adulta, não promoveu dano à aprendizagem espacial. *Diferença significativa dos animais adolescentes e adultos expostos ao EtOH sobre o tempo de permanência no QA ($p=0,0044$; $p<0,0001$) em relação aos animais controle, respectivamente. Resultados expressos como a média \pm e.p.m de 10-12 animais por grupo e análise estatística pelo Teste t-Student.

4.3. ETANOL EM BD PROVOCOU PREJUÍZOS SOBRE A FLEXIBILIDADE COGNITIVA EM UMA TAREFA ESPACIAL EM ANIMAIS ADULTOS, MAS NÃO EM ADOLESCENTES.

Diferentemente do que foi observado na MCD da aprendizagem espacial, a memória de curta duração da flexibilidade cognitiva não demonstrou-se prejudicada após BD de EtOH na adolescência. Em contrapartida, BD de EtOH na vida adulta resultou em prejuízo sobre a flexibilidade cognitiva de curta duração, observado pela ausência da redução do tempo despendido para encontrar a plataforma submersa dos animais do grupo etanol em relação aos animais do grupo controle, como observado graficamente na Figura 7.

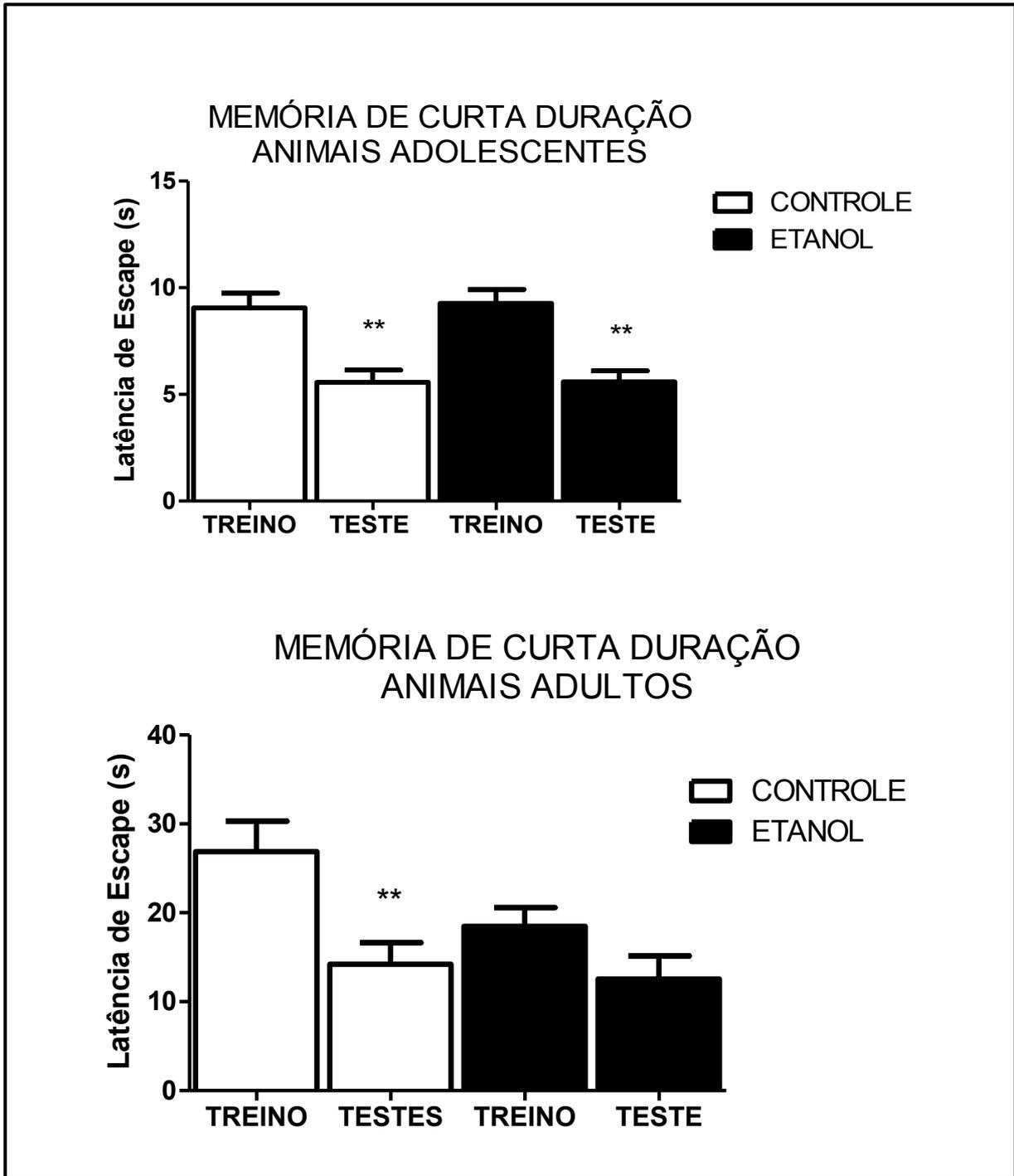


Figure 7: Fase teste da flexibilidade cognitiva de curta duração. Tempo (s) despendido pelos animais dos grupos Controle/EtOH adolescentes e adultos até encontrar a plataforma submersa na “nova” posição (quadrante III do tanque). Na fase teste, os animais adolescentes expostos a H₂O/EtOH demonstraram redução significativa do tempo de latência de escape ($p > 0,05$) em relação aos animais controle, entretanto, animais adultos expostos ao EtOH não apresentaram redução significativa da latência de escape em relação ao grupo controle. Resultados expressos como a média \pm e.p.m. de 10-12 animais por grupo, análise dos dados por ANOVA de uma via seguida do teste Tukey.

Da mesma forma, durante a avaliação da memória de longa duração, foi demonstrado que a exposição ao EtOH em BD durante a adolescência não provocou prejuízo sobre a da flexibilidade cognitiva, diferentemente dos animais expostos ao EtOH na fase adulta, que apresentaram prejuízo sobre a MLD da flexibilidade cognitiva, observado pela redução do parâmetro de número de entradas no quadrante alvo, assim como, pela redução do tempo de latência de entrada neste quadrante.

Foi observado que os animais adolescentes e adultos expostos ao EtOH, assim como encontrado na MLD da aprendizagem, apresentaram aumento do parâmetro de tempo dentro do quadrante alvo, o que pode estar relacionado à prejuízos motores observados neste estudo, como a redução da velocidade de nado, mas que será alvo de pesquisa para trabalhos futuros (Figura 8)

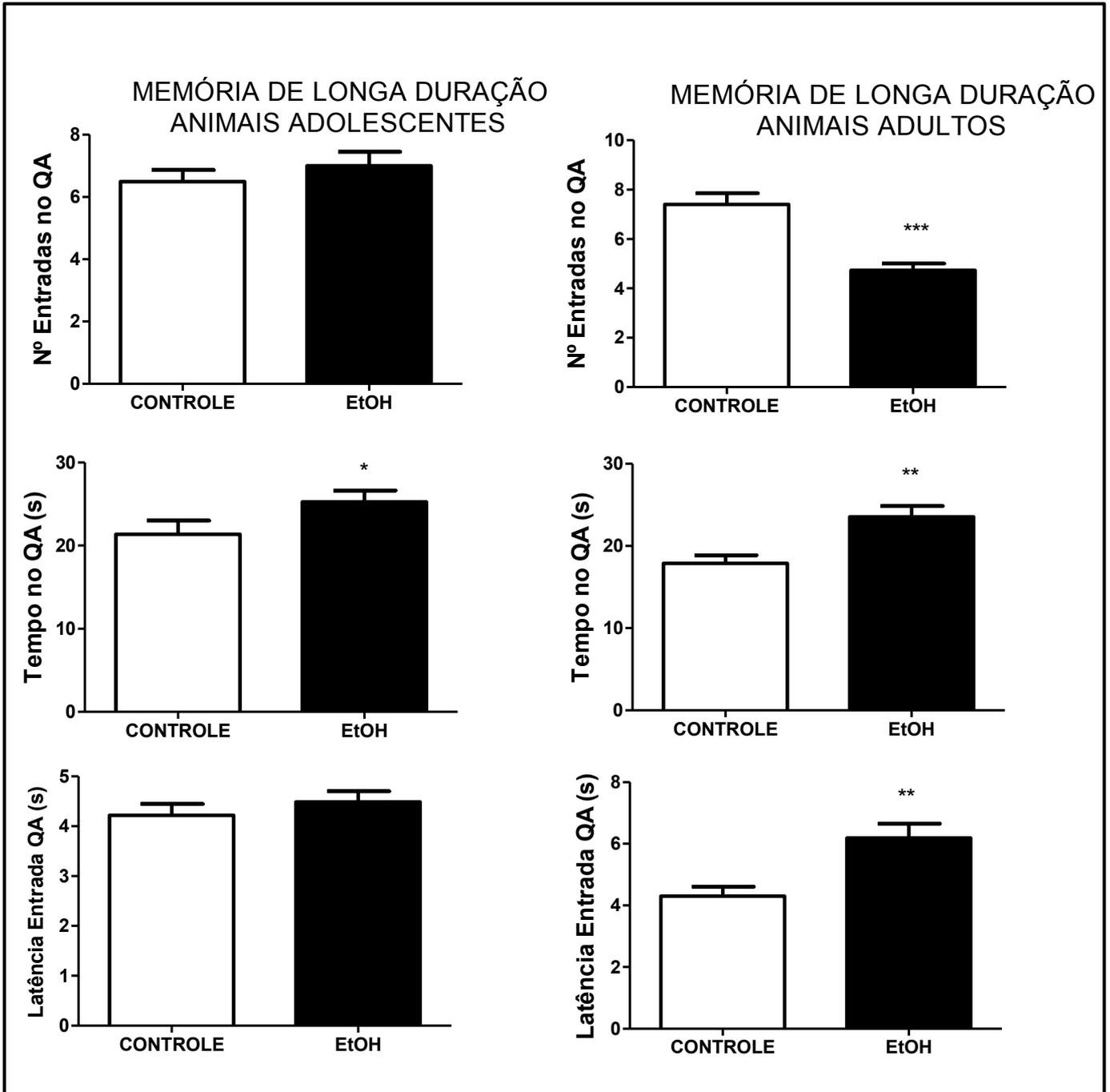


Figure 8: Fase teste da flexibilidade cognitiva de longa duração, 24h após a etapa de treinamento. A retirada do EtOH no padrão BD de consumo durante adolescência não promoveu dano à flexibilidade cognitiva, em contrapartida, animais adultos apresentaram prejuízos sobre a flexibilidade, representados pela redução dos parâmetros de Nº entradas no QA ($p < 0,0001$) e Latência de Entrada (QA) ($p = 0,0014$), em relação ao grupo controle. Observado também o aumento significativo dos animais adolescentes e adultos expostos ao EtOH no tempo de permanência no QA em relação aos animais controle. Resultados expressos como a média \pm e.p.m de 10-12 animais por grupo e análise estatística pelo Teste t-Student.

V. DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Em relação ao parâmetro bioquímico investigado neste trabalho, a quantificação das concentrações de álcool no sangue (BAC) comprovaram que em nosso estudo foram atingidas concentrações sanguíneas de EtOH correspondentes àquelas utilizadas em protocolos de BD. Como determinado pelo NIAAA, valores de $BAC \geq 0,08$ g/dL ou 80 mg/dL, dentro de um período de duas horas, correspondem à exposição ao etanol em *binge drinking* (TAPIA-ROJAS et al., 2017; HOSOVA & SPEAR, 2017). Além disto, segundo Livy e colaboradores (2003), após administração orogástrica de EtOH em ratos, os níveis sanguíneos atingem picos de concentração em um período de 60 minutos após a administração da droga.

Desta forma, após 60 minutos, a dose de 3g/kg/dia (solução de 20% v/v), utilizada neste estudo, produziu concentrações sanguíneas de EtOH na média de 177,8mg/dL. Portanto, de acordo com a definição assumida pelo NIAAA, podemos admitir que o protocolo de dose e período de intoxicação deste estudo foi suficiente para produzir BACs correspondentes ao modelo de intoxicação em BD em ratas.

Dentro dos mais diversos protocolos de exposição ao EtOH, a memória espacial e a flexibilidade cognitiva são frequentemente avaliadas no Teste do Labirinto Aquático. No protocolo desenvolvido neste estudo, durante a fase da vida que compreende toda a adolescência, a exposição intermitente ao EtOH por três dias consecutivos seguidos de quatro dias de abstinência (3 dias *on*/4 dias *off*), na dose de 3g/kg/dia por via oral, não provocou prejuízo sobre a aprendizagem espacial, nem mesmo após a reversão da tarefa espacial, sugerindo que, da mesma forma, a flexibilidade cognitiva não foi afetada.

Estudos apontam que a qualidade da aprendizagem espacial é dependente da integridade funcional do hipocampo, principalmente da porção dorsal (CHIN et al., 2010) e que, em contra partida, o processo de aquisição de uma nova aprendizagem parece ser uma atividade relacionada muito mais à região cortico-frontal (MARSZALEK-GRABSKA et al., 2018; CREWS & BOETTIGER, 2009).

Com efeito, é sabido que neurônios piramidais que compõe o hipocampo atingem altas taxas de disparos localizados durante travessias espaciais, por isso também são conhecidas como "*place cells*" (células de lugar), e os disparos são reduzidos à zero ao final destas atividades (CHIN et al., 2010; EGO-STENGEL & WILSON, 2007).

Evidências indicam que a especificidade espacial destas células é reduzida na adolescência após exposição aguda ao EtOH, porém, o mesmo não foi observado após a exposição crônica e intermitente, sugerindo que este padrão de consumo não foi prejudicial à aprendizagem espacial de ratos jovens quando os animais foram treinados em dias em que não receberam tratamento com a substância (MATTHEWS et al., 2017; CHIN et al., 2010; SKIKE et al., 2012; SILVERS et al., 2006).

De fato, nossos resultados demonstraram que a aprendizagem de uma atividade espacial no TLA não foi prejudicada nos dias subsequentes à exposição ao EtOH crônico e intermitente durante a adolescência, sugerindo que a memória espacial de animais adolescentes durante a abstinência, de certa forma, seja resistente aos efeitos deletérios da exposição em BD ao EtOH, e que talvez o hipocampo adolescente não seja tão frágil quanto se acreditava (SKIKE et al., 2012; CHIN et al., 2010).

Da mesma maneira, também não foi observado, neste estudo, prejuízo à flexibilidade cognitiva quando os animais foram expostos a uma nova atividade de referência espacial no TLA, depois da retirada do EtOH crônico e intermitente durante a adolescência.

A ausência de prejuízos sobre a aprendizagem e flexibilidade espacial na adolescência, pode estar relacionada ao protocolo de administração utilizado neste trabalho. Isto porque, evidências indicam que quadros de abstinência podem influenciar diretamente as alterações cognitivas geradas durante a administração do EtOH, onde períodos de abstinência alcoólica poderiam facilitar o surgimento de neuroadaptação compensatória, reduzindo o prejuízo sobre a aprendizagem (SPEAR, 2018). Além disto, também existe a hipótese de que o dano estaria relacionado à dose, com existência de relação linear entre a dose consumida de etanol e os efeitos deletérios sobre aprendizagem (SPEAR, 2018; NOVIER et al., 2012; ACHESON et al., 2001).

De fato, Marszalek-Grabska e colaboradores (2018), demonstraram que a administração crônica por cinco dias consecutivos de etanol na dose de 5g/kg, promoveu dano sobre a flexibilidade cognitiva em uma tarefa espacial de reversão. Em contrapartida, nossos resultados demonstraram que a exposição intermitente ao EtOH durante a adolescência, em uma dose menor, não foi suficientemente capaz de gerar prejuízo à flexibilidade cognitiva. Com isto, nossos resultados sustentam a hipótese de

que a dose e períodos intercalados de abstinência alcoólica poderiam favorecer processos neuroadaptativos compensatórios, sugerida por Spear (2018).

Notavelmente, a dose, o tempo e a duração do consumo de EtOH são determinantes para a recuperação dos prejuízos na memória hipocampo-dependente durante abstinência (CIPPITELLI et al., 2010). Além disto, é provável que os efeitos do EtOH sobre as habilidades cognitivas não sejam tão globais quanto se supunha anteriormente (WHITE et al., 2000).

De fato, a mesma dose de 3g/kg/dia, via oral, no padrão BD de 3 dias *on*/ 4 dias *off*, foi suficiente para promover prejuízos sobre a memória de trabalho em uma atividade de reconhecimento de objetos na fase inicial do período de abstinência ao EtOH, mas foi observada a reversão do dano após 14 dias de abstinência (FERNANDES et al., 2018).

Acredita-se que as alterações neuroadaptativas observadas durante a abstinência ao consumo excessivo e prolongado de EtOH, sejam reflexo da regulação positiva dos receptores de Glu (*up-regulation*), assim como, da regulação negativa dos receptores GABAérgicos (*down-regulation*) [BRUST, 2010; ALELE & DEVAUD, 2005].

De fato, a retirada após o consumo crônico de EtOH provoca aumento da densidade e atividade de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA, ocasionando a hiperatividade destes receptores (BRUST, 2010; MARSZALEK-GRABSKA et al., 2018).

Os receptores de Glu, principalmente do tipo NMDA, desempenham um papel essencial na formação de novas sinapses e no crescimento neuronal, através da potenciação de longo prazo (LTP, sigla do termo em inglês – *long-term potentiation*). Da mesma forma, são responsáveis pelo enfraquecimento e inibição da atividade de algumas sinapses por meio da depressão de longo prazo (LTD, sigla do termo em inglês – *long-term depreciation*), promovendo a manutenção do funcionamento correto das redes neurais, principalmente em etapas de intenso neurodesenvolvimento, como a adolescência (BARRIA & MALINOW, 2005).

Portanto, LTD e LTP são diretamente influenciadas pelos receptores NMDA e, em conjunto, são fatores que determinam a plasticidade neuronal sináptica, essencial nos mecanismos de aprendizagem e memória (BARRIA & MALINOW, 2005; MARSZALEK-GRABSKA et al., 2018).

Desta forma, é possível que hiperatividade dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA durante períodos de abstinência ao EtOH crônico, principalmente em uma etapa

de intensa neurogênese, como a adolescência, esteja envolvida nos processos de plasticidade sináptica essenciais aos mecanismos de aprendizagem espacial e flexibilidade cognitiva (MARSZALEK-GRABSKA et al., 2018), contrapondo-se aos danos cognitivos provocados durante a administração de EtOH.

De fato, evidências apontam que há inibição destes receptores durante a exposição aguda ao EtOH (NAGY, 2008), porém, durante o consumo crônico, foi observado o aumento da atividade e expressão sináptica dos mesmos (PIAN et al., 2010), relacionado a respostas homeostáticas adaptativas (MARSZALEK-GRABSKA et al., 2018).

Além disto, o EtOH também tem influência sobre o fluxo de cálcio (Ca^{++}) através da membrana celular, reduzindo-o no período de intoxicação e promovendo o aumento do seu influxo no período de abstinência alcoólica (ZALESKI et al., 2004). Assim, além de aumentar a expressão das subunidades dos receptores NMDA, o EtOH crônico também aumenta a funcionalidade destes receptores levando ao aumento compensatório da densidade dos canais de Ca^{++} , que persiste durante o período de abstinência (KENNEDY & LIU, 2003).

É extensivamente discutido na literatura que, da mesma forma como o aumento da expressão dos receptores NMDA, o influxo de Ca^{++} através destes receptores desempenha um papel crítico na plasticidade pré- e pós-sináptica, um mecanismo celular importante para aprendizagem e memória (CHANDRASEKAR, 2013).

Desta forma, o aumento da expressão dos receptores NMDA glutamatérgicos e do influxo de Ca^{++} através destes receptores, durante a abstinência após exposição crônica ao EtOH, associado a hiperatividade neuronal intrínseca da adolescência, podem estar relacionados à ausência de prejuízos em funções cognitivas dependentes de hipocampo e córtex frontal, envolvidas com aprendizagem espacial e flexibilidade cognitiva.

Além disto, Chin e colaboradores (2010) demonstraram que a exposição aguda ao EtOH na adolescência inibe de forma dependente os disparos de neurônios piramidais do hipocampo, enquanto que a administração crônica e intermitente evita a inibição destas células imediatamente após o período de exposição ao EtOH. Esta diferença pode estar associada aos níveis de alopregnanolona ($3\alpha,5\alpha$ -THP), um esteroide neuroativo sintetizado da progesterona, caracterizado por ser o mais abundante e

eficiente modulador positivo endógeno dos receptores GABAA (CHIN et al., 2010; CHIN et al., 2011; KUMAR et al., 2009; SILVERS et al., 2006)

De fato, a $3\alpha,5\alpha$ -THP age diretamente nos neurônios piramidais do hipocampo (CHINA et al., 2011; TOKUNAGA et al., 2003) e animais adolescentes expostos à administração aguda de EtOH demonstram aumento dos níveis deste esteroide na região hipocampal. Em contrapartida, este efeito foi significativamente reduzido em animais submetidos à exposição crônica e intermitente ao EtOH, que apresentaram níveis basais de $3\alpha,5\alpha$ -THP, assim como os animais do grupo controle (SILVERS et al., 2006).

Adicionalmente, estudos anteriores demonstraram que o EtOH crônico e intermitente durante a adolescência não produziu alterações nos níveis corticais de $3\alpha,5\alpha$ -THP, nem mesmo após a administração aguda da droga (SILVERS et al., 2006). Isto favorece a hipótese de que, na adolescência, as mudanças nos níveis deste esteroide são dependentes da região cerebral, após exposição ao EtOH em BD (KHISTI et al., 2004; SILVERS et al., 2006).

Desta forma, a diminuição seletiva de $3\alpha,5\alpha$ -THP no hipocampo de animais adolescentes extensivamente relacionada à exposição crônica e intermitente de EtOH, pode estar envolvida na ausência do comprometimento sobre a aprendizagem espacial encontrada neste trabalho. A hipótese considerada é que haja a formação de mecanismos de tolerância, ainda desconhecidos, sensíveis ao aumento dos níveis de $3\alpha,5\alpha$ -THP hipocampal e isto pode estar envolvido em mecanismos subjacentes de tolerância ao comprometimento da aprendizagem espacial após administração crônica de EtOH (SILVERS et al., 2006; SILVERS et al., 2003; CHIN et al., 2010; SKIKE et al., 2012).

No entanto, a relação entre a exposição ao EtOH e os danos na memória espacial ainda é bastante controversa e pouco conclusiva entre às diferentes fases do desenvolvimento cerebral (CHIN et al., 2010). Estudos anteriormente realizados confrontam resultados que demonstram que ratos adultos são mais sensíveis que adolescentes aos danos provocados pelo EtOH sobre memória espacial (RAJENDRAN & SPEAR, 2004), com resultados que demonstram o contrário (MARKWIESE et al., 1998; CREWS et al., 2016).

De fato, o cérebro adolescente é amplamente vulnerável aos danos cerebrais provocados pela exposição intermitente ao EtOH, mas nem sempre isto se manifesta em danos comportamentais (CHIN et al., 2010), como observado em nosso estudo.

Como demonstrado neste trabalho, a aprendizagem espacial dependente do hipocampo e a flexibilidade cognitiva não foram prejudizadas pela exposição em BD ao EtOH durante o período da adolescência. Nossos resultados podem estar envolvidos com os mecanismos de neuroadaptação compensatória dos receptores NMDA de Glu ou ainda com a tolerância ao aumento dos níveis de $3\alpha,5\alpha$ -THP, bem como pela intensa plasticidade sináptica no hipocampo (ZHANG et al., 2017), fatores que parecem servir de suporte cognitivo necessário para a conclusão da tarefa espacial no teste do labirinto aquático.

Porém, nossa proposta de investigação abrange não somente períodos de intenso neurodesenvolvimento cerebral, como também estágios mais tardios da vida, marcados pela redução significativa de neurogênese, além do início de processos fisiológicos neurodegenerativos. De fato, nosso estudo demonstrou que nestes períodos mais tardios da vida, como na fase adulta, a exposição ao EtOH em BD crônico e intermitente foi capaz de gerar danos cognitivos evidentes nos primeiros dias de abstinência.

Como discutido anteriormente, sabe-se que existe uma forte ligação entre a neurogênese e uma gama de processos cognitivos e, é possível, que o processo neurogênico desigual, assim como, a maior formação e integração de circuitos neurais, mais evidentes no encéfalo adolescente, possa vir a ser uma via de redução de danos provocados pelo EtOH na adolescência, mas menos eficientes na fase adulta (Kempermann, 2002; Shors et al., 2001; Leuner et al., 2006; Squeglia et al., 2011; He & Crews, 2007; Vetreno & Crews, 2015; Crews et al., 2016).

Nossos resultados evidenciaram que o EtOH crônico e intermitente não demonstrou prejudicar a aprendizagem espacial em animais adultos durante o período de abstinência, anteriormente observado por Crews e colaboradores (2016). Em contra partida, alguns estudos, assim como este, tem demonstrado que esta forma de exposição ao EtOH tem resultado em prejuízo comportamental relacionado à flexibilidade cognitiva na vida adulta (Vetreno & Crews, 2012; Crews et al., 2016).

De fato, evidências demonstram que a expressão proteica das subunidades de receptores NMDA no hipocampo (NR1, NR2A e NR2B, por exemplo), tornaram-se

significativamente maiores em ratos adultos após a exposição crônica ao EtOH, no entanto, apresentaram-se reduzidas no córtex frontal (Pian et al., 2010).

Estes achados sustentam os resultados obtidos com este estudo, em que a aprendizagem espacial, intimamente relacionada à atividade hipocampal, não foi prejudicada durante a abstinência ao EtOH crônico e intermitente em animais adultos, porém, em contra partida, o mesmo não foi observado na investigação da flexibilidade cognitiva, intimamente associada à integridade da região cortico-frontal (CHIN et al., 2010; MARSZALEK-GRABSKA et al., 2018; CREWS & BOETTIGER, 2009).

De fato, estudos tem demonstrado que déficits sobre a aprendizagem de reversão estão relacionados à disfunções no córtex frontal, amplamente sensíveis à exposição ao etanol (Crews & Boettiger 2009; Kuzmin, 2011), amplamente relacionada à alteração da neurotransmissão nas áreas corticais frontais resultando em prejuízo cognitivo (Kuzmin, 2011).

Além disto, o consumo de álcool tem sido relacionado à processos neurodegenerativos que contribuem para a perda de funções executivas. Em geral, os alcoólatras humanos, tanto homens quanto mulheres, têm um volume cerebral mais baixo de estruturas cerebrais corticais e subcorticais, que incluem tanto os volumes comuns de massa cinzenta e de substância branca abaixo das médias correspondentes à idade e que pode apresentar-se mais comprometedor em fases da vida onde a renovação das redes neurais encontra-se reduzida, como períodos pós-adolescência (Crews & Boettiger, 2009).

Desta forma, é possível que especificidade regional de dano do etanol sobre os receptores do tipo NMDA seja mais acentuada durante a vida adulta, em relação à fase da adolescência (Pian et al., 2010) e que regiões corticais sejam mais susceptíveis à estes prejuízos quando comparadas ao hipocampo e sua intensa neurogênese, o que poderia estar relacionado ao comprometimento de atividades cognitivas dependentes do córtex frontal mas não em atividades cognitivas relacionadas à integridade hipocampal.

VI. CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou que nos dias iniciais da abstinência ao EtOH após exposição em padrão intermitente e episódico (BD), não foi possível observar prejuízo sobre a aprendizagem espacial e flexibilidade cognitiva no período da vida que compreende a adolescência, mas que o mesmo não foi observado na vida adulta, no que diz respeito à memória de flexibilidade diante de uma atividade de reversão espacial.

A partir dos resultados gerados, este estudo confronta com a hipótese de que o EtOH é uma substância promotora de prejuízos sobre a aprendizagem espacial e sobre a flexibilidade cognitiva, principalmente em períodos mais suscetíveis do amadurecimento cerebral, como a adolescência, e reforça a hipótese de que, na verdade, estes danos são dependentes de muitas variáveis como dose, período de exposição e quadros de abstinência alcoólica durante e após a exposição à droga.

Além disto, nosso estudo também sustenta a hipótese de que o EtOH não resulte em danos globais ao cérebro e que pode produzir efeitos com intensidades diferentes dependendo da região cerebral, que podem se apresentar como efeitos danosos e promover prejuízos comportamentais ou não, como demonstrado em nossos resultados cognitivos, em que a região córtico-frontal demonstrou-se menos resistente aos efeitos danosos do EtOH quando comparada a região hipocampal e sua intensa atividade neural.

Da mesma maneira, este estudo é um dos pioneiros em contrastar os efeitos após a exposição ao EtOH em BD sobre a aprendizagem espacial e a flexibilidade cognitiva em períodos opostos do desenvolvimento cerebral. Isto contribui para fomentar estudos acerca dos processos neuroadaptativos, neurogênicos e neurodegenerativos do sistema nervoso central em períodos distintos do amadurecimento cerebral, visando esclarecer de que forma estes mecanismos interferem na resposta comportamental diante do uso de drogas, como o etanol.

VII. CONSIDERAÇÕES FINAIS

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Futuras análises serão realizadas acerca da aprendizagem espacial e flexibilidade cognitiva em diferentes períodos do desenvolvimento cerebral, buscando investigar as concentrações farmacocineticamente ativas em áreas cerebrais essenciais para estas funções após exposição ao EtOH em BD em ratas, a fim de mimetizar o público feminino devido ser uma população em que o padrão de consumo desta droga tem aumentado.

Além disto, estudos posteriores do nosso grupo irão concentrar as investigações sobre os prejuízos motores observados neste trabalho, avaliando as áreas cerebrais relacionadas com este parâmetro e a vulnerabilidade aos efeitos prejudiciais do EtOH sobre as mesmas.

VIII. REFERÊNCIAS

8. REFERÊNCIAS

- ACEVEDO, M.B. et al. **Age-dependent effects of stress on ethanol-induced motor activity in rats.** *Psychopharmacology*, v. 230, p. 389–398, 2013.
- ACHESON, S.K. et al. **Effects of acute or chronic ethanol exposure during adolescence on behavioral inhibition and efficiency in a modified water maze task.** *PLoS ONE*, v. 8, n. 10, 2013.
- ALELE, P.E.; DEVAUD, L.L. **Differential Adaptations in GABAergic and Glutamatergic Systems During Ethanol Withdrawal in Male and Female Rats.** *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, v. 29, n. 6, p. 1027–1034, 2005.
- AMODEO, L.R. et al. **Alcohol drinking during adolescence increases consumptive responses to alcohol in adulthood in Wistar rats.** *Alcohol*, v. 59, p. 43–51, 2017.
- ARAIN, M. et al. **Maturation of the adolescent brain.** *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, v. 9, p. 449–461, 2013.
- BARRIA, A.; MALINOW, R. **NMDA Receptor Subunit Composition Controls Synaptic Plasticity by Regulating Binding to CaMKII.** *Neuron*, v. 48, p. 289–301, 2005.
- BRUST, J.C.M. **Ethanol and Cognition: Indirect Effects, Neurotoxicity and Neuroprotection: A Review.** *International Journal of Environmental Research and Public Health*, p. 1540–1557, 2010.
- CEDERBAUM, A.I. **Alcohol Metabolism.** *Clinical Liver Disease*, v. 16, p. 667–685, 2012.
- CENTRO DE INFORMAÇÕES SOBRE SAÚDE E ÁLCOOL (2016). **Metabolismo do álcool.** Disponível em: <<http://www.cisa.org.br/artigo/5536/metabolismo-alcool.php>>. Acesso em: 17 de Janeiro de 2018.
- CHANDRASEKAR, R. **Alcohol and NMDA receptor: current research and future direction.** *Frontiers in Molecular Neuroscience*, V. 6, 2013.
- CHIN, V.S. et al. **Effect of acute ethanol and acute allopregnanolone on spatial memory in adolescent and adult rats.** *Alcohol*, v. 45, p. 473–483, 2011.
- CHIN, V.S.; SKIKE, C.E.V.; MATTHEWS, D.B. **Effects of ethanol on hippocampal function during adolescence: A look at the past and thoughts on the future.** *Alcohol*, v. 44, p. 3-14, 2010.
- CIPPITELLI, A. et al. **Reversibility of object recognition but not spatial memory impairment following binge-like alcohol exposure in rats.** *Neurobiology of Learning and Memory*, v. 94, p. 538–546, 2010.

COMELLI, L. et al. **Visits for alcohol-related problems in a large urban Emergency Department. Results of a 15-year survey.** *Acta Biomedica*, v. 88, n. 4, p. 514-518, 2016.

CONTRERAS, M.L. et al. **NADPH oxidase isoform 2 (NOX2) is involved in drug addiction vulnerability in progeny developmentally exposed to ethanol.** *Frontiers in Neuroscience*, v. 11, 2017.

CREWS, F.T. et al. **Adolescent Alcohol Exposure Persistently Impacts Adult Neurobiology and Behavior.** *Pharmacological Reviews*, 2016.

CREWS, F.T.; BOETTIGER, A.C. **Impulsivity, frontal lobes and risk for addiction.** *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, v. 93, p. 237–247, 2009.

EGO-STENGEL, V; WILSON, M.A. **Spatial Selectivity and Theta Phase Precession in CA1 Interneurons.** *Hippocampus*, v. 17, p. 161–174, 2007.

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

FRITZ, B.M.; BOEHM II, S.L. **Adenosinergic regulation of binge-like ethanol drinking and associated locomotor effects in male C57BL/6J mice.** *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, v. 135, p. 83–89, 2015.

GIFFORD, A.N.; ESPAILLAT, M.P.; GATLEY, J.S. **Biodistribution of Radiolabeled Ethanol in Rodents.** *Drug Metabolism And Disposition*, v. 36, n. 9, 2008.

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

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

HAIDER, S; TABASSUM, S; PERVEEN, T. **Scopolamine-induced greater alterations in neurochemical profile and increased oxidative stress demonstrated a better model of dementia: A comparative study.** *Brain Research Bulletin*, 2016.

HOSOVÁ, D; SPEAR, L. **Voluntary binge consumption of ethanol in a sweetened, chocolate-flavored solution by male and female adolescent sprague dawley rats.** *Alcoholism: Clinical And Experimental Research*, v. 41, n. 3, p. 541 – 550, 2017.

HUNT, P.S.; BARNET, R.C. **Adolescent and adult rats differ in the amnesic effects of acute ethanol in two hippocampus-dependent tasks: Trace and contextual fear conditioning.** *Behavioural Brain Research*, v. 298, p. 78–87, 2016.

INSTITUTO NACIONAL DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA PARA POLÍTICAS PÚBLICAS DO ÁLCOOL E OUTRAS DROGAS (2013). **II levantamento nacional de álcool e**

drogas. Disponível em: <<http://dssbr.org/site/2013/06/ii-levantamento-nacional-de-alcool-e-drogas-mostra-o-consumo-de-alcool-crescente-e-desigual-pela-populacao-brasileira/>>. Acesso em: 05 de Janeiro de 2018.

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

JOHNSTON, L.D. et al. **Monitoring the future national results on adolescent drug use: overview of key findings.** National Institute on Drug Abuse, p. 09, 2009.

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

KEMPERMANN, G. **Why new neurons? Possible functions for adult hippocampal neurogenesis.** Journal of Neuroscience, v. 22, p. 635—638, 2000.

KENNEDY, R.H.; LIU, S.J. **Sex differences in L-type calcium current after chronic ethanol consumption in rats.** Toxicology and Applied Pharmacology, v. 15, n. 3, p. 196 – 203, 2003.

KHISTI, R. T. et al. **Ethanol-induced elevation of 3 alpha-hydroxy-5 alpha-pregnan-20-one does not modulate motor incoordination in rats.** Alcoholism: Clinical and Experimental Research, v. 28, p. 1249–1256, 2004.

KUMAR, S. et al. **The role of GABAA receptors in the acute and chronic effects of ethanol: a decade of progress.** Psychopharmacology, v. 205, n. 4, 2009.

KUMAR, S. et al. **The role of GABAA receptors in the acute and chronic effects of ethanol: a decade of progress.** Psychopharmacology, v. 205, n. 4, 2009.

LEE, K.M. et al. **Negative affect and excessive alcohol intake incubate during protracted withdrawal from binge-drinking in adolescent, but not adult, mice.** Frontiers in Psychology, v. 8, 2017.

LEUNER, B; GOULD, E; SHORS, T.J. **Is there a link between adult neurogenesis and learning?** Hippocampus, v. 16, p. 216–224, 2006.

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

MALDONADO-DEVINCCI, M.A. et al. **Alcohol during adolescence selectively alters immediate and long-term behavior and neurochemistry.** Alcohol, v. 44, n.1, p. 57–66, 2010.

MARKWIESE, B.J. et al. **Differential effects of ethanol on memory in adolescent and adult rats.** Alcoholism: Clinical and Experimental Research, v. 22, n. 2, 1998.

MARSZALEK-GRABSKA, M. et al. **ADX-47273, a mGlu5 receptor positive allosteric modulator, attenuates deficits in cognitive flexibility induced by withdrawal from 'binge-like' ethanol exposure in rats.** Behavioural Brain Research, v. 338, p. 9–16, 2018.

MATTHEWS, D.B; MITTLEMAN, G. **Age-dependent effects of chronic intermittent ethanol treatment:** Cross motor behavior and body weight in aged, adult and adolescent rats. Neuroscience Letters, 2017.

MCCLINTICK, J.N. et al. **Gene expression changes in glutamate and GABA-A receptors, neuropeptides, ion channels and cholesterol synthesis in the periaqueductal gray following binge-like alcohol drinking by adolescent alcohol-preferring (P) rats.** Alcoholism, Clinical and Experimental Research, 2017.

NAGY, J. **Alcohol Related Changes in Regulation of NMDA Receptor Functions.** Current Neuropharmacology, v. 6, p. 39-54, 2008.

NATIONAL INSTITUTE ON ALCOHOL ABUSE AND ALCOHOLISM (2004). **National Institute of Alcohol Abuse and Alcoholism Council approves definition of binge drinking.** Disponível em: <<http://pubs.niaaa.nih.gov/publications>>. Acesso em: 20 de Fevereiro de 2018.

NATIONAL INSTITUTE ON ALCOHOL ABUSE AND ALCOHOLISM (2016). **Overview of Alcohol Consumption: Drinking Levels Defined.** Disponível em:<<http://www.niaaa.nih.gov/alcoholhealth/overviewalcoholconsumption/moderatebinge drinking> >. Acesso em: 13 de Fevereiro de 2018.

NOGALES, F. et al. **Oral or intraperitoneal binge drinking and oxidative balance in adolescent rats.** Chemical Research in Toxicology, v. 27, n. 11, p. 1926-1933, 2014.

NOVIER, A.; DIAZ-GRANADOS, J.L.; MATTHEWS, D.B. **Alcohol use across the lifespan:** An analysis of adolescent and aged rodents and humans. Pharmacology, Biochemistry and Behavior, v. 133, p. 65 – 82, 2015.

NUMI, M. et al. **Brain ethanol in AA, ANA, and Wistar rats monitored with one-minute microdialysis.** Alcohol, v. 11, n. 4, p. 315–321, 1994.

OBAD, A. et al. **Alcohol-Mediated Organ Damages: Heart and Brain.** Frontiers in Pharmacology, v. 9, 2018.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Global status report on alcohol and health (2014).** Disponível em: <http://www.who.int/substance_abuse/publications/global_alcohol_report/en/>. Acesso em: 12 de Janeiro de 2018.

ORIO, L. et al. **Young alcohol binge drinkers have elevated blood endotoxin, peripheral inflammation and low cortisol levels: neuropsychological correlations in women.** Addiction Biology, 2017.

ORNELAS, L.C. **The effects of acute alcohol on motor impairments in adolescent, adult, and aged rats.** Alcohol, 2014.

PARADA, M. et al. **Definición del concepto de consumo intensivo de alcohol adolescente (binge drinking).** Adicciones, v. 23, n.1, p. 53 – 63, 2011.

PEANA, A.T. et al. **From ethanol to salsolinol: Role of ethanol metabolites in the effects of ethanol.** Journal of Experimental Neuroscience, v. 10, p. 137–146, 2016.

PETIT, G. et al. **Gender differences in reactivity to alcohol cues in binge drinkers: A preliminary assessment of event-related potentials.** Psychiatry Research, v. 209, p. 494–503, 2013.

PIAN, J.P. et al. **N-methyl-D-aspartate receptor subunit expression in adult and adolescent brain following chronic ethanol exposure.** Neuroscience, v. 170, p. 645–654, 2010.

PLACE, R. et al. **Bidirectional prefrontal-hippocampal interactions support context-guided memory.** Natural Neuroscience, v. 19, n. 8, p. 992–994, 2016.

QUERTEMONT, E.; GREEN, H.L.; GRANT, K.A. **Brain ethanol concentrations and ethanol discrimination in rats: effects of dose and time.** Psychopharmacology, v. 168, p. 262–270, 2003.

RAJEDRAN, P.; SPEAR, L.P. **The effects of ethanol on spatial and nonspatial memory in adolescent and adult rats studied using an appetitive paradigm.** Annals New York Academy of Sciences, p. 441–444, 2004.

RAMCHANDANI, V.A.; BOSRON, W.F.; LI, T.K. **Research advances in ethanol metabolismo.** Pathologie Biologie, v. 49, p. 676–682, 2001.

SANCHEZ-MARIN, L. et al. **Effects of intermittent alcohol exposure on emotion and cognition: a potential role for the endogenous cannabinoid system and neuroinflammation.** Frontiers in Behavioral Neuroscience, v. 11, 2017.

SEMPLE, B.D. et al. **Brain development in rodents in humans: identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species.** Progress in Neurobiology, p. 1 – 16, 2013.

SHNITKO, T.A.; SPEAR, L.P.; ROBINSON, D.L. **Adolescent binge-like alcohol alters sensitivity to acute alcohol effects on dopamine release in the nucleus accumbens of adult rats.** Psychopharmacology, v. 233, n. 3, p. 361–371, 2016.

SHORS TJ et al., **Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories.** Nature, v. 410, p. 372–376, 2001.

SILVA, L.S. et al., **Petiveria alliacea exerts mnemonic and learning effects on rats.** Journal of Ethnopharmacology, v. 169, p. 124 – 129, 2015.

SILVERI, M.M. **GABAergic contributions to alcohol responsivity during adolescence:** Insights from preclinical and clinical studies. Pharmacology & Therapeutics, 2014.

SILVERS, J. M. et al. **Chronic intermittent injections of high-dose ethanol during adolescence produce metabolic, hypnotic, and cognitive tolerance in rats.** Alcoholism: Clinical and Experimental Research, v. 27, p. 1606–1612, 2003.

SILVERS, J.M. et al. **Chronic intermittent ethanol exposure during adolescence reduces the effect of ethanol challenge on hippocampal allopregnanolone levels and Morris water maze task performance.** Alcohol, v. 39, p. 151–158, 2006.

SKIKE, C.E.V. et al. **The effect of chronic intermittent ethanol exposure on spatial memory in adolescent rats:** The dissociation of metabolic and cognitive tolerances. Brain Research, p. 34–39, 2012.

SPEAR, L. **Adolescents and alcohol:** Acute sensitivities, enhanced intake, and later consequences. Neurotoxicology and Teratology, n. 41, p. 51–59, 2014.

SPEAR, L. **Effects of adolescent alcohol consumption on the brain and behaviour.** Nature, 2018.

SPEAR, L.P. **The adolescent brain and age-related behavioral manifestations.** Neuroscience & Biobehavioral Reviews, v. 24, p. 417–463, 2000.

SUBSTANCE ABUSEMENTAL HEALTH SERVICES ADMINISTRATION (SAMHSA), 2014. Disponível em: <<https://www.samhsa.gov/data/sites/default/files/NSDUH-DetTabs2014/NSDUH-DetTabs2014.pdf>>. Acesso em 22 de Janeiro de 2018.

TAPIA-ROJAS, C. et al. **Adolescent binge alcohol exposure affects the brain function through mitochondrial impairment.** Molecular Neurobiology, 2017.

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

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

VONGHIA, L. et al. **Acute alcohol intoxication.** European Journal of Internal Medicine, v. 19, n. 8, p. 561–567, 2008.

WALKER, B.M.; EHLERS, C.L. **Age-related differences in the blood alcohol levels of Wistar rats.** Pharmacology, Biochemistry and Behavior, v. 91, p. 560–565, 2009.

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

YANG, J. et al. **Role of microglia in ethanol-induced neurodegenerative disease:** Pathological and behavioral dysfunction at diferente developmental stages. *Pharmacology & Therapeutics*, p. 17, 2014.

ZALESKI, M. et al. **Aspectos neurofarmacológicos do uso crônico e da Síndrome de Abstinência do Álcool.** *Revista Brasileira de Psiquiatria*, v. 26, p. 40 – 42, 2004.

ZEIGLER, D.W. et al. **The neurocognitive effects of alcohol on adolescents and college students.** *Preventive Medicine*, v. 40, p. 23–32, 2005.

ZHANG, H. et al. Prenatal stress-induced impairments of cognitive flexibility and bidirectional synaptic plasticity are possibly associated with autophagy in adolescent male-offspring. *Experimental Neurology*, v. 298, p. 68–78, 2017.

IX. ANEXOS

9.1. ANEXO A – PARECER DE AUTORIZAÇÃO DA COMISSÃO DE BIOÉTICA



UFPA
Universidade Federal do Pará

Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "ABSTINÊNCIA APÓS EXPOSIÇÃO AO CONSUMO INTERMITENTE DE ETANOL: DIFERENÇAS NA CONCENTRAÇÃO ENCEFÁLICA E NA ATIVIDADE COGNITIVA DE RATAS EM DIFERENTES FASES DO DESENVOLVIMENTO CEREBRAL? ", protocolada sob o CEUA nº 4372131017, sob a responsabilidade de **Cristiane do Socorro Ferraz Maia e equipe; Taiana Cristina Vilhena Sarmento Carvalho; Cristiane do Socorro Ferraz Maia** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Pará (CEUA/UFPA) na reunião de 24/11/2017.

We certify that the proposal "ABSTINENCE AFTER EXPOSURE TO INTERMITTENT ETHANOL CONSUMPTION: DIFFERENCES IN THE ENCEPHALIC CONCENTRATION AND THE COGNITIVE ACTIVITY OF RATS IN DIFFERENT STAGES OF CEREBRAL DEVELOPMENT?", utilizing 70 isogenic rats (70 females), protocol number CEUA 4372131017, under the responsibility of **Cristiane do Socorro Ferraz Maia and team; Taiana Cristina Vilhena Sarmento Carvalho; Cristiane do Socorro Ferraz Maia** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Para (CEUA/UFPA) in the meeting of 11/24/2017.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa](#)

Vigência da Proposta: de [11/2017](#) a [03/2019](#)

Área: [Farmácia](#)

9.2. ANEXO B – ARTIGO PUBLICADO

Hindawi
Oxidative Medicine and Cellular Longevity
Volume 2019, Article ID 5452727, 10 pages
<https://doi.org/10.1155/2019/5452727>



Research Article

“Special K” Drug on Adolescent Rats: Oxidative Damage and Neurobehavioral Impairments

Sabrina de Carvalho Cartágenes,¹ Luanna Melo Pereira Fernandes,¹
Taiana Cristina Vilhena Sarmiento Carvalheiro,¹ Thais Miranda de Sousa,¹
Antônio Rafael Quadros Gomes,² Marta Chagas Monteiro ²,
Ricardo Sousa de Oliveira Paraense,³ Maria Elena Crespo-López,³ Rafael Rodrigues Lima ⁴,
Enéas Andrade Fontes-Júnior ¹, Rui Daniel Prediger,⁵ and Cristiane Socorro Ferraz Maia ¹

¹Laboratory of Pharmacology of Inflammation and Behavior, Pharmacy Faculty, Institute of Health Sciences, Federal University of Pará, Belém, Pará, Brazil

²Laboratory of Microbiology and Immunology of Teaching and Research, Pharmacy Faculty, Institute of Health Science, Federal University of Pará, Belém, Pará, Brazil

³Laboratory of Molecular Pharmacology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Pará, Belém, Pará, Brazil

⁴Laboratory of Functional and Structural Biology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Pará, Belém, Pará, Brazil

⁵Department of Pharmacology, Center of Biological Sciences, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

Correspondence should be addressed to Cristiane Socorro Ferraz Maia; crismaia@ufpa.br

Received 17 April 2018; Revised 19 December 2018; Accepted 31 December 2018; Published 14 March 2019

Guest Editor: Margherita Neri