



EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO ETANOL NA ADOLESCÊNCIA SOBRE A
AGRESSIVIDADE, A ANSIEDADE E A ATIVIDADE INFLAMATÓRIA DE RATOS
WISTAR

Letícia Scheidt

Dissertação de Mestrado

Porto Alegre, RS, 2013

EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO ETANOL NA ADOLESCÊNCIA SOBRE A
AGRESSIVIDADE, A ANSIEDADE E A ATIVIDADE INFLAMATÓRIA DE RATOS
WISTAR

Letícia Scheidt

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestrado em
Psicologia sob orientação da Profa. Dra. Rosa Maria Martins de Almeida

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Instituto de Psicologia

Programa de Pós-Graduação em Psicologia

Laboratório de Pesquisa Experimental, Neurociências e Comportamento

Outubro, 2013

Aos meus pais, Paulo e Tamara, por serem tudo o que são e terem sempre me incentivado a ser o que sou.

Ao meu irmão Felipe, pelo exemplo e inspiração que sempre foi pra mim.

Ao Mano, que mora no meu coração.

AGRADECIMENTOS

À orientadora, Prof. Dra. Rosa Maria Martins de Almeida;

À Prof. Dra. Lisiane Bizarro;

À Laura Stertz e ao Gabriel Fries, do Laboratório de Psiquiatria Molecular;

À Fabíola e à Marta, do CEUA do Hospital de Clínicas de Porto Alegre;

Aos colegas do LPNeC Jonatas, Augusto, Bárbara, Fernanda, Keitiline, Sarah, Roberto;

Ao G9;

Aos colegas da Unila, especialmente Vanessa Silvestro e Elias de Souza Oliveira;

Aos meus amigos;

À minha família;

Ao Rodrigo Birck.

*“Não vivemos nem viveremos pela eternidade,
mas é através de nossas vidas que a eternidade vive.
Ser imortal é para pessoas fracas – os fortes vivem
cada dia como se fosse seu último, até o dia de sua
morte”.*

Samuel Eggers

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	7
LISTA DE FIGURAS	8
RESUMO	9
ABSTRACT	10
CAPITULO I.....	11
INTRODUÇÃO.....	11
CAPÍTULO II.....	14
RESUMO	14
ABSTRACT	15
INTRODUÇÃO.....	16
Adolescência e desenvolvimento	16
Ansiedade, exposição a risco e agressividade	16
Cérebro e padrão de consumo <i>binge</i>	17
Atividade inflamatória.....	18
MÉTODO	20
Delineamento.....	20
Sujeitos	20
Procedimentos gerais.....	20
Procedimentos específicos.....	21
Comportamento de risco e ansiedade	21
Agressividade	23
Coleta de tecidos.....	24
Determinação de proteínas	24
Análise dos dados	24
RESULTADOS	26
Ansiedade e exposição ao risco	26
Agressividade	27
Citocinas e BDNF.....	28
DISCUSSÃO	32
CAPÍTULO III	35
CONCLUSÃO.....	35
REFERÊNCIAS	37
ANEXOS	45
Carta de aprovação no comitê de ética no uso de animais da UFRGS.....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. <i>Divisão dos grupos experimentais, de acordo com a administração de álcool via gavagem</i>	20
Tabela 2. <i>Fatores para comportamentos no labirinto em cruz elevado</i>	26
Tabela 3. <i>Escores a partir da fórmula da agressão total: soma das frequências (mordida, postura lateral, pin e nip) com a duração (postura lateral e pins)</i>	27

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Linha de tempo com todos os procedimentos do experimento</i>	21
Figura 2. <i>Aparato Labirinto em Cruz Elevado</i>	22
Figura 3. <i>Concentração de TNF-α no córtex pré-frontal (CPF) e no hipocampo de animais controle (n=12) e de animais que tiveram administração de 1g/kg de álcool (A10, n=12) e de 3g/kg (A30, n=16)</i>	28
Figura 4. <i>Concentração de IL-10 no córtex pré-frontal (CPF) e no hipocampo de animais controle (n=12) e de animais que tiveram administração de 1g/kg de álcool (A10, n=12) e de 3g/kg (A30, n=16)</i>	29
Figura 5. <i>Concentração de IL-1α no córtex pré-frontal (CPF) e no hipocampo de animais controle (n=12) e de animais que tiveram administração de 1g/kg de álcool (A10, n=12) e de 3g/kg (A30, n=16)</i>	30
Figura 6. <i>Concentração de BDNF no córtex pré-frontal (CPF) e no hipocampo de animais controle (n=12) e de animais que tiveram administração de 1g/kg de álcool (A10, n=12) e de 3g/kg (A30, n=16)</i>	31

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar os danos permanentes que o consumo de bebidas alcoólicas na adolescência pode ocasionar, em termos de atividade inflamatória e alterações comportamentais. Para tanto, foram utilizados ratos Wistar machos (n=40), divididos em três grupos, para os quais foi administrado etanol por gavagem, em três concentrações: 0% w/v (grupo controle); 5% w/v, 1,0 g/kg (grupo A10); e 15% w/v, 3,0 g/kg (grupo A30). Testes comportamentais foram realizados para avaliar os comportamentos de ansiedade e de agressividade. As concentrações de citocinas TNF- α , IL-10 e IL-1 α e de BDNF foram quantificadas nas estruturas hipocampo e córtex pré-frontal. Embora a administração de etanol não tenha provocado alterações nos comportamentos, a concentração de BDNF diminuiu significativamente no hipocampo no grupo A10. O BDNF é um regulador de desenvolvimento, plasticidade e comportamento de adição, portanto, discutiu-se o envolvimento da atividade neurotrófica diminuída com a neurodegeneração induzida pelo etanol no cérebro adulto.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the long term damage that adolescent consumption of alcohol can cause, both on inflammatory activity and behavioral changes. Male Wistar rats (n=40) were divided into three groups with the concentrations 0% w/v (control group); 5% w/v, 1,0 g/kg (A10 group); and 15% w/v, 3,0 g/kg (A30 group). Behavioral tests were conducted to evaluate anxiety and aggressive behaviors. TNF- α , IL-10 and IL-1 α cytokines and BDNF concentrations were quantified in hippocampus and pre-frontal cortex. Ethanol administration did not induce behavioral changes, but the concentration of BDNF in the hippocampus was diminished significantly in the A10 group. BDNF is a development, plasticity and addiction behavior regulator, therefore, we discussed the involvement of diminished neurotrophic activity and neurodegeneration induced by ethanol at the adult brain.

CAPITULO I

INTRODUÇÃO

A adolescência é uma etapa do desenvolvimento de transição entre a infância e a vida adulta, em que há diversas mudanças biopsicossociais que predispõem intenso comportamento exploratório e exposição a riscos (Spear, 2000). Este é o período em que são mais comuns a experimentação e o início do uso de drogas, como a nicotina e o álcool (Maggs & Schulenberg, 2005).

O uso de álcool entre adolescentes é tão comum na sociedade, que consiste em um problema de saúde pública, sendo associado com maiores índices de dependência de substâncias e com uma progressão mais rápida do uso ocasional para a dependência de álcool na vida adulta (Stansfield & Kirstein, 2007). O álcool, droga legalizada e amplamente consumida em diversos ambientes culturais, tem tido uso cada vez mais frequente e intenso, caracterizando o chamado *binge drinking*, em que há o consumo de sete ou mais drinques por semana, ou cinco ou mais drinques por ocasião (Englund, Egeland, Oliva, & Collins, 2008).

Na adolescência, ocorrem alterações profundas no cérebro, que podem ter impacto duradouro no comportamento e no processamento cognitivo. O sistema nervoso central está em desenvolvimento, portanto interferências como o uso de drogas durante esta fase pode ter um importante papel em manter o uso na adultidade (Spear, 2000).

O uso de substâncias nesse período também pode afetar o desenvolvimento de regiões corticais, alterando funções que podem persistir na vida adulta (Wahlstrom, Collins, White, & Luciana, 2010). Um estudo de Little e colegas (1996) demonstrou que os jovens podem ser menos sensíveis aos efeitos sedativos do álcool e, conseqüentemente, mais vulneráveis ao uso de grandes quantidades dessa droga.

Em seres humanos, o cérebro continua a se desenvolver até aproximadamente 20 anos de idade, com ocorrência de mielinização e seleção sináptica em regiões do córtex frontal na fase final da adolescência (Casey & Jones, 2010). Essas mudanças são importantes para o estabelecimento de funções como controle de impulsos, planejamento, motivação, tomada de decisão e interação social (Squeglia, Schweinsburg, Pulido, & Tapert, 2011).

Há evidências de que o etanol influencia a liberação de alguns dos principais neurotransmissores presentes no Sistema Nervoso Central (SNC), como dopamina, serotonina, noradrenalina e peptídeos opióides (Brown & Tapert, 2004). O etanol ativa o disparo neuronal dopaminérgico na área tegmental ventral do mesencéfalo e também a liberação dopaminérgica no núcleo accumbens – estruturas que fazem parte da via

mesolímbica, essencial para os efeitos de recompensa, e que pode estar envolvido no consumo e dependência ao álcool (Doremus-Fitzwater, Varlinskaya, & Spear, 2010).

Um início precoce do comportamento de beber está associado a maiores níveis de agressividade, não só durante a adolescência, mas também na idade adulta (Hingson, Heeren, & Zakocs, 2001). Da mesma forma, estudos longitudinais mostram que há relação com a impulsividade (Semenova, 2011) e a dependência de substâncias (Englund et al., 2008). É difícil concluir, entretanto, qual a relação causal – se existe – entre esses aspectos comportamentais e os efeitos do consumo de álcool na adolescência.

A precocidade e a severidade do consumo de álcool também podem ser influenciadas por um conjunto de características relacionadas à capacidade de auto-controle, como agressividade e impulsividade. Com relação à desinibição comportamental, a dependência ao álcool na vida adulta parece ser influenciada pelo grau de desatenção (Fergusson, Horwood, & Ridder, 2007), agressividade (Kellam, 1980) e impulsividade (McGue, Iacono, Legrand, Malone, & Elkins, 2001) na infância e na adolescência.

O consumo precoce de álcool pode ser um marcador para a desinibição comportamental, que por sua vez pode ser exacerbada pelos efeitos do álcool sobre o comportamento. Essa inter-relação corrobora a perspectiva atual de que os mecanismos cerebrais envolvidos na impulsividade, atenção e agressividade também estão associados ao uso e dependência de substâncias (Molina, 2005).

Essa associação tem sido evidenciada também por resultados de experimentos com modelos animais. Esses estudos têm demonstrado que a exposição ao álcool durante a adolescência pode ocasionar prejuízos de memória e coordenação motora, reduzida neurogênese no hipocampo (Ward et al., 2009), além de ansiedade e comportamento do tipo depressivo aumentados. A intoxicação intermitente com etanol em repetidas doses de 3.0 g/kg foi capaz de ocasionar morte celular no neocórtex, cerebelo e hipocampo de ratos, através de processos inflamatórios. Essas alterações resultaram em prejuízos que persistiram na vida adulta dos animais (Pascual, Blanco, Cauli, Miñarro, & Guerri, 2007).

A exposição do cérebro imaturo a drogas de abuso promove mudanças no desenvolvimento que irão provocar mudanças farmacológicas, celulares e, em última instância, comportamentais no adulto de uma maneira diferente da exposição a estes mesmos elementos após a adolescência (Andersen et al., 2008).

Nesta dissertação, será apresentado um artigo que trata da relação entre o uso de álcool na adolescência e o comportamento ansioso e agressivo na vida adulta, bem como as alterações em marcadores inflamatórios em duas importantes estruturas, o córtex pré-frontal e o hipocampo. O artigo apresenta um experimento em modelo animal, utilizando um protocolo

de ansiedade e exposição ao risco, o labirinto em cruz elevado; um protocolo de agressividade através da interação residente-intruso; e a quantificação de citocinas pró e anti-inflamatórias e o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), por citometria de fluxo.

CAPÍTULO II

EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO ETANOL NA ADOLESCÊNCIA SOBRE A AGRESSIVIDADE, A ANSIEDADE E A ATIVIDADE INFLAMATÓRIA DE RATOS WISTAR

Letícia Scheidt, Jonatas Argemi Foster Passos, Augusto Viana Pires, Lisiane Bizarro e Rosa Maria Martins de Almeida

RESUMO

O consumo de bebidas alcoólicas na adolescência pode ocasionar danos importantes e permanentes no desenvolvimento cerebral, envolvendo atividade inflamatória e alterações comportamentais. O objetivo deste artigo foi avaliar as consequências da exposição ao etanol em diferentes concentrações na adolescência sobre estas variáveis na adultez. Ratos Wistar machos (n=40) foram divididos em três grupos e foi administrado etanol por gavagem, nas concentrações 0% (n=12, controle), 5% (w/v), 1,0 g/kg (n=12), e 15% (w/v), 3,0 g/kg (n=16). O comportamento de ansiedade foi avaliado com o aparato labirinto em cruz elevado e a agressividade com protocolo residente-intruso. As concentrações de citocinas TNF- α , IL-10 e IL-1 α e de BDNF foram quantificadas nas estruturas hipocampo e córtex pré-frontal. A administração de etanol não induziu alterações nos comportamentos, porém a concentração de BDNF diminuiu no hipocampo no grupo com dosagem intermediária. O BDNF é um regulador de desenvolvimento, plasticidade e comportamento de adição, portanto, discutiu-se o envolvimento da atividade neurotrófica diminuída com a neurodegeneração induzida pelo etanol no cérebro adulto.

Palavras-chave: Adolescência, Abuso de Álcool, Agressividade, Ansiedade, Atividade Inflamatória.

ABSTRACT

Drinking alcohol in adolescence can provoke important and long term damage in brain development, which includes inflammatory activity and behavioral changes. The aim of this paper was to evaluate the consequences in adulthood of different concentrations of ethanol exposure in adolescence. Male Wistar rats (n=40) were divided into three groups with the concentrations: 0% (n=12, control group), 5% (w/v), 1,0 g/kg (n=12), and 15% (w/v), 3,0 g/kg (n=16). Anxiety behavior was evaluated with elevated plus maze and aggressive behavior with resident-intruder protocol. TNF- α , IL-10 and IL-1 α cytokines and BDNF concentrations were quantified in hippocampus and pre-frontal cortex. Ethanol administration did not induce behavioral changes, but the concentration of BDNF in the hippocampus was diminished in the medium concentration group. BDNF is a development, plasticity and addiction behavior regulator, therefore, we discussed the involvement of diminished neurotrophic activity and neurodegeneration induced by ethanol at the adult brain.

Keywords: Adolescence, Alcohol Abuse, Aggressive behavior, Anxiety, Inflammatory Activity.

INTRODUÇÃO

Adolescência e desenvolvimento

A adolescência é normalmente considerada o período de 12 a 20 ou 25 anos de idade em humanos e o período de 28 a 42 dias pós-natal (DPN) em ratos (Dahl, 2004). Esta fase pode ser caracterizada em termos comportamentais por tendência a níveis mais altos de exposição a risco, maior comportamento exploratório, busca de novidade e sensações, interação social e alta atividade motora (Crews, He, & Hodge, 2007). Estas características são evolutivamente importantes para promover a aquisição de habilidades necessárias para maturação e independência, na direção da adultez, estando presentes em diferentes espécies. Em ratos, considera-se que com 21 dias de idade o animal é capaz de evitar predadores, localizar fontes de comida e comer, além de estar se preparando para estabelecer um território doméstico (Spear, 2004). Estes parâmetros, associados ao desenvolvimento das estruturas cerebrais, orientam para o início da adolescência. Os mesmos aspectos necessários para a maturação, como busca por novidade e exposição a risco, também podem ser preditores do uso de álcool e drogas em adolescentes (Englund et al., 2008).

Segundo a literatura, um início mais precoce do uso de álcool pode estar associado com uma maior probabilidade de se envolver com danos não intencionais e acidentes automotivos (Hingson, 2006). Dentre adolescentes, os que iniciam o uso de álcool mais cedo têm uma propensão maior a se engajar em comportamento violento, que possa causar lesões a si ou aos outros (Hingson et al., 2001).

Ansiedade, exposição a risco e agressividade

Medo e ansiedade são termos que descrevem as reações psicofisiológicas a um ambiente adverso. O primeiro se caracteriza pela presença real de uma ameaça, enquanto o segundo representa um estado defensivo a um estímulo ameaçador, sem uma relação temporal ou espacial próxima (Stoppel, Albrecht, Pape, & Stork, 2006).

O comportamento agressivo tem sido associado com várias condições neurológicas e psiquiátricas, dentre elas a ansiedade e os distúrbios depressivos (Veenema & Neumann, 2007). A agressividade em ratos é necessária para a aquisição e a manutenção de alimento, para o estabelecimento de território e para acasalamento. Ratos machos vivem em territórios, com algumas fêmeas e filhotes e nestes espaços há demarcações e atitudes de dominação para afastar intrusos. Em colônias, o comportamento agressivo é infrequente. Porém as interações com animais de fora são chamadas agressões residente-intruso (Yap & Miczek, 2007). Neste

experimento, o rato foi exposto a um período de isolamento, para diminuir as referências sociais da colônia e gerar o comportamento de luta para com um intruso.

A interação álcool-comportamento agressivo é bastante debatida na literatura, devido às importantes consequências socioeconômicas. Os dados apontam para uma influência do álcool no comportamento violento, nem sempre apenas pelos efeitos farmacológicos da bebida, mas por já existir uma expectativa do usuário de que o álcool levaria à agressão (Exum, 2006).

Cérebro e padrão de consumo *binge*

O cérebro adolescente passa por um estado único de transição enquanto acontece a maturação. Uma variedade de sistemas está se modificando no cérebro adolescente, desde a composição molecular e a sensibilidade de receptores de neurotransmissores até mudanças mais globais como o volume do córtex pré-frontal que declina durante esse período tanto em humanos como em ratos. Há também mudanças no número de sinapses, nos níveis da inervação dopaminérgica e colinérgica, bem como modificações em uma variedade de regiões cerebrais (Crews, Mdzinarishvili, Kim, He, & Nixon, 2006). Portanto, o cérebro adolescente é diferente do adulto.

Os adolescentes também diferem na sua resposta ao etanol. Ratos adolescentes são menos sensíveis aos efeitos sedativos do etanol e têm uma tolerância aguda rápida (Spear & Varlinskaya, 2005). Talvez até em função disso, o *binge drinking* é um hábito muito presente nos círculos sociais adolescentes, cujas características são os excessivos níveis de consumo.

Os prejuízos cerebrais induzidos pelo *binge drinking* envolvem aspectos de disfunção cognitiva e neurodegeneração após esse tipo de exposição e esse padrão costuma levar a um desenvolvimento de tolerância e dependência que posteriormente não só promove consumo exagerado, mas também está associado a mudanças da fisiologia, estrutura e função do cérebro (Crews & Nixon, 2009). Em modelo animal, os danos parecem ser maiores em cérebros adolescentes que em adultos, particularmente em aprendizagem e processos de memória (Crews et al., 2007).

Apesar da alta prevalência de uso e abuso de álcool e transtornos relacionados na adolescência, a compreensão real dos efeitos do consumo em tenra idade sobre o desenvolvimento cerebral e a cognição está apenas começando. Entender as respostas do cérebro ao etanol nessa faixa etária é importante justamente porque é o período em que os indivíduos costumam começar a beber (Maggs & Schulenberg, 2005). Apesar de existirem restrições legais ao uso de álcool por adolescentes, esta prática é bastante usual e sem controle efetivo (Perry et al., 2000).

A neurogênese é um processo que tem sua maior evidência nos estágios iniciais do desenvolvimento, com grande parte dos neurônios formados nos períodos pré-natais ou de recém-nascido. No entanto, ela continua na idade adulta em regiões cerebrais específicas até a senescência. Há reconhecida importância da neurogênese hipocampal no aprendizado e na memória, bem como nos estados afetivos e de humor. Um estudo indicou que os adolescentes têm níveis mais altos de neurogênese no hipocampo e ela é muito sensível à inibição induzida por álcool (Crews et al., 2006). O presente estudo escolheu o hipocampo para cálculo de proteínas devido a esta importância, uma vez que o prejuízo ocasionado durante a adolescência pode trazer alterações duradouras na vida adulta.

O consumo de um alto número de doses alcoólicas por episódio parece estar correlacionado a um volume menor do córtex pré-frontal. Bebedores sociais que consomem mais pesadamente apresentam humor mais negativo e pior desempenho em tarefas de funções executivas (Brown & Tapert, 2004). Dada esta importância, este estudo também privilegiou a análise bioquímica do córtex pré-frontal.

Atividade inflamatória

Citocinas são um grupo de proteínas solúveis e peptídeos que modulam as atividades funcionais das células e dos tecidos, a comunicação intercelular. São reguladoras centrais de crescimento e diferenciação de leucócitos, no sistema imune. As citocinas são produzidas por vários tipos celulares e têm inúmeros alvos, em todas as regiões do organismo. (Goncharova & Tarakanov, 2007).

Estudos têm relacionado os níveis de citocinas e a patogênese de inúmeros distúrbios, doenças inflamatórias e psicopatologias como transtornos de humor (You et al., 2011). O fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) é uma citocina do tipo pró-inflamatória, ou seja, o seu aumento sinaliza uma inflamação no organismo (Rettori et al., 2007). A interleucina 10 (IL-10) é uma citocina anti-inflamatória secretada pelos linfócitos auxiliares tipo 2. Regula a resposta imune e inibe reações alérgicas (Moore, O'Garra, Malefyt, Vieira, & Mosmann, 1993). A citocina interleucina 1 (IL-1) é um potente defensor do hospedeiro frente a infecções e danos, tanto dentro quanto fora do SNC, participando da manutenção da resposta inflamatória (Vitkovic et al., 2000).

O Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF) é uma das proteínas da família das neurotrofinas mais estudadas, e está envolvida na neuroproteção, incluindo sobrevivência neuronal, arborização dendrítica, plasticidade neuronal e neurodesenvolvimento (Kapczinski, Frey, Kauer-Sant'Anna, & Grassi-Oliveira, 2008).

O reconhecimento do envolvimento da ativação neuroimune nos danos causados pela exposição crônica ao álcool é algo relativamente recente (Collins & Neafsey, 2011). Estudos evidenciam a alteração dos níveis de expressão de fatores neurotróficos em diversos transtornos psiquiátricos como transtorno bipolar, esquizofrenia, transtorno obsessivo-compulsivo e depressão. Por atuarem na plasticidade e na sobrevivência celular do sistema nervoso central (SNC), estudos em tecidos cerebrais se mostram de grande relevância.

O modelo de *binge drinking* demonstra que a degeneração induzida pelo álcool provavelmente ocorre devido à inibição de múltiplos fatores ligados à geração celular, atrofia celular e morte celular. Experimentos demonstram que o álcool altera o equilíbrio da sinalização pró-inflamatória versus a pró-sobrevivência durante a intoxicação etílica. A ativação que o etanol promove da transcrição do fator de transcrição nuclear κ B (NF- κ B) aumenta as citocinas pró-inflamatórias e o estresse oxidativo induzindo enzimas que promovem degeneração. A redução que o etanol promove na transcrição de pCREB (fator de transcrição, *cAMP responsive element-binding protein*) sensibiliza os neurônios a danos, influenciando na perda da neurogênese (Crews & Nixon, 2009). Alcoolistas humanos apresentam citocinas cerebrais e marcadores de microglia aumentados, o que é consistente com esses processos e acaba contribuindo para a perda de substância cinza e branca, bem como a disfunção cognitiva (Collins & Neafsey, 2011).

Um estudo (Kerns, 2005) com camundongos indicou que a ativação do sistema de recompensa mesolímbico pelo uso agudo do etanol (2g/kg) produz alterações na expressão gênica que parecem cruciais para a base molecular dos comportamentos aditivos. Foram identificadas diferenciações gênicas no núcleo accumbens, córtex pré-frontal e área ventral tegmental. Os genes responsivos ao etanol foram relacionados a neuroplasticidade, incluindo a presença de BDNF no núcleo accumbens e diversos genes potenciais candidatos ligados a comportamentos do etanol. Portanto alterações em regiões específicas do cérebro quanto à sinalização e plasticidade neuronal podem ser componentes críticos no desenvolvimento de fenótipos de comportamentos ligados ao etanol como dependência, tolerância e abstinência.

MÉTODO

Delineamento

A pesquisa foi realizada a partir de um delineamento experimental (Frankfort-Nachmias, 2008). A variável independente foi o grupo (controle ou experimental – A10 e A30) e as variáveis dependentes foram a agressividade, a ansiedade e a atividade inflamatória.

A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) (Anexo A).

Sujeitos

Foram utilizados 40 ratos Wistar machos com idade de 21 dias, alojados na Unidade de Experimentação Animal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, com 12h de ciclo claro/escuro, com controle da temperatura ambiente (20°-22°C) e umidade relativa do ar (40-60%). Os animais foram alojados em grupos de quatro ratos por caixa, em caixas de poliuretano medindo 24cm de largura, 38cm de comprimento e 15cm de altura. Após um período de aclimação de 7 dias ao biotério, foi realizado sorteio para definição dos grupos (A10, A30 e Controle) por caixa, de acordo com a administração do tratamento por gavagem (ver tabela 1). Os animais pesavam entre 63g e 96g no 28° dia pós-natal (DPN) e receberam ração chow e água potável sem restrições ao longo do experimento.

Tabela 1

Divisão dos grupos experimentais, de acordo com a administração de álcool via gavagem

	Grupos		
	Controle (n = 12)	A10 (n = 12)	A30 (n = 16)
<i>Substância</i>	Água	Etanol	Etanol
<i>Dose</i>	0% w/v 1 e 2ml/100g, alternados	5% w/v 1ml/100g	15% w/v 2ml/100g
<i>Peso álcool</i>	0 g/kg	1,0 g/kg	3,0 g/kg

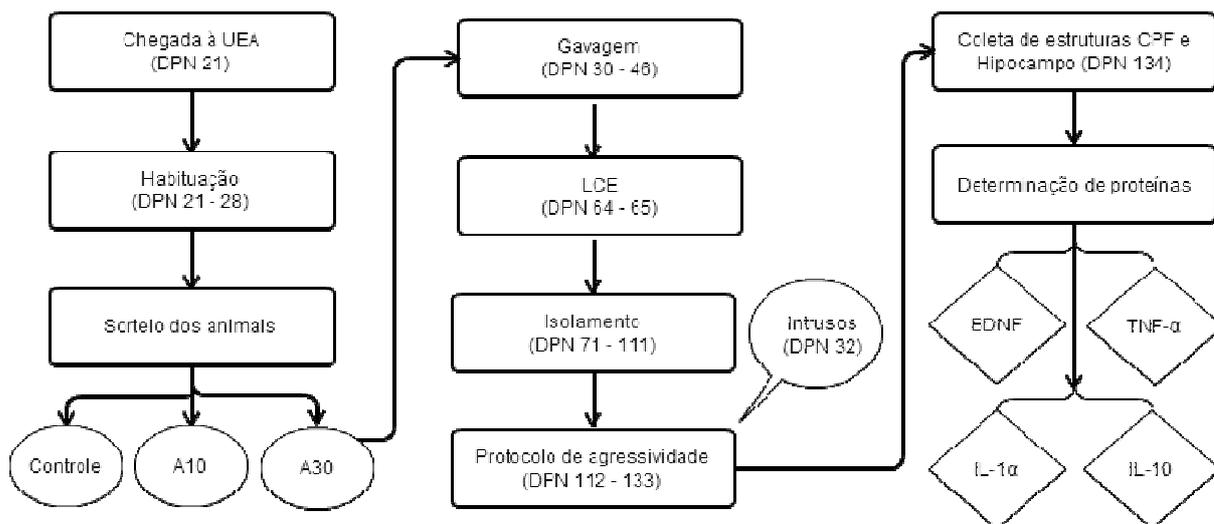
Procedimentos gerais

Após a distribuição dos sujeitos em grupos, foi realizada uma exposição intermitente ao etanol, do 30° até o 46° DPN. O protocolo foi baseado no proposto por Pascual e colegas (2007), porém utilizando gavagem em vez de injeção intraperitoneal. Os animais receberam, a cada 48h, a administração de doses de 15% (w/v), 3,0 g/kg de etanol (95% EtOH) diluídas em água (grupo A30); 5% (w/v), 1,0 g/kg de etanol diluída em água (grupo A10); ou apenas água (grupo Controle); totalizando oito administrações por animal. A solução foi, portanto,

aplicada com uma agulha de gavagem acoplada a uma seringa, por via oral. Os sujeitos foram pesados imediatamente antes de cada exposição, para o cálculo preciso da quantidade em relação ao peso. Este modelo simula o comportamento *binge*, um padrão de consumo caracterizado pelo uso intermitente em altas doses, comum na adolescência (Pascual et al., 2007). Os procedimentos estão ilustrados na Figura 1.

Figura 1

Linha de tempo com todos os procedimentos do experimento



Procedimentos específicos

Comportamento de risco e ansiedade

Para a realização da avaliação do comportamento de risco e ansiedade, foi utilizado o Labirinto em Cruz Elevado, aparato de madeira, que consiste de quatro braços (50cm X 10 cm), dois abertos e dois fechados. As laterais destes últimos são fechadas por paredes de 40cm de altura. O aparato é elevado em 50cm do chão, conforme visto na figura 2 (Cruz, Frei, & Graeff, 1994; Johnston & File, 1991).

Figura 2

Aparato Labirinto em Cruz Elevado



Os animais foram testados entre o 64° e o 65° DPN, metade em cada dia, por ordem de sorteio, no Labirinto em Cruz Elevado, de acordo com o protocolo de Walf e Frye (2007). Em uma exposição única, os ratos foram posicionados individualmente no centro do labirinto de frente para um dos braços abertos. Foi analisada a atividade dos animais no labirinto, através do número de entradas nos braços abertos e nos braços fechados e o tempo de permanência em cada um desses braços, durante um período de 5 minutos. Foi considerado entrada quando o animal colocou as quatro patas em um dos braços. Após a retirada de cada rato do labirinto, o aparato foi limpo e desinfetado antes da colocação do próximo. O experimento foi filmado com uma câmera instalada a cerca de um metro acima do aparato e gravado com o programa *Windows Movie Maker*.

Após treinamento, dois juízes analisaram os vídeos e analisaram os seguintes comportamentos, de acordo com Toledo-Rodriguez e Sandi (2011), Walf e Frye (2007) e Robert e colegas (2011):

Comportamento do tipo ansioso: latência, tempo total de permanência e número de entradas nos braços fechados;

Comportamento do tipo não-ansioso: latência, tempo total de permanência e número de entradas nos braços abertos;

Comportamento de risco / avaliação de risco: latência, frequência e duração do comportamento de esticar (colocar a cabeça para fora do braço fechado, investigando o ambiente); latência, frequência e duração do mergulho (prolongamento da cabeça para além dos limites do braço aberto);

Outros: latência, frequência e duração do *grooming* (comportamento auto-limpante), latência, frequência e duração do *rearing* (erguer-se).

Agressividade

Para realizar a avaliação do comportamento agressivo, os animais foram dispostos em caixas individuais transparentes e isolados visualmente através de divisórias colocadas entre as caixas. O período de isolamento foi entre o 71º e o 111º DPN, totalizando 40 dias. O isolamento é necessário para que o animal expresse maior repertório de comportamentos agressivos ao interagir com intrusos. Foram utilizados 35 animais de 32 dias de idade como intrusos, colocados em situação de confronto com os residentes, alternadamente, sem que nenhum par residente-intruso fosse repetido ao longo das interações.

O protocolo utilizado para o experimento de agressividade foi embasado no proposto por Miczek (1979). No 112º DPN, iniciaram-se as interações. Um animal intruso, que residia em grupo com outros animais, foi colocado na caixa-moradia transparente de cada rato tratado ou não com etanol durante a adolescência. O experimento foi realizado durante o ciclo escuro, duas vezes por semana, ao longo de quatro semanas, totalizando sete eventos. Cada exposição foi filmada com uma câmera munida com dispositivo infravermelho instalada em frente à caixa e gravada com o programa *Windows Movie Maker*. As interações foram realizadas concomitantemente por quatro equipes distintas, com quatro pares de animais. Os intrusos foram demarcados em todo o corpo, para facilitar a visualização e a diferenciação do residente na filmagem.

O tempo de interação foi de 10 minutos a partir da primeira mordida do residente no intruso. Não havendo o comportamento de morder, o experimento foi encerrado 10 minutos após a introdução do animal na caixa. Caso o intruso tenha mordido o residente posteriormente ao residente tê-lo feito, o experimento seguiu normalmente. No entanto, se o intruso expressou o comportamento de morder primeiro, o experimento foi imediatamente interrompido.

Posteriormente, um observador treinado fez o registro dos comportamentos visualizados nas gravações, além de dois juízes que analisaram vídeos de animais sorteados. Foram computadas latência, frequência e duração de cada um dos seguintes comportamentos:

1) Elementos agressivos: mordida ao intruso (*attack bite*), postura lateral (*sideway threat*), submissão com as duas patas (*pin*), beliscão (*nips*) e perseguição (*pursuits*).

2) Elementos não-agressivos: auto-limpeza (*grooming*), caminhada (*walking*), levantar-se (*rearing*), escanear (*scanning*) e cheirar (*sniffing*).

Coleta de tecidos

No dia posterior ao término do protocolo de agressividade, os animais controles e os experimentais foram sacrificados por decapitação. Os encéfalos foram imediatamente dissecados sobre uma placa no gelo e as estruturas córtex pré-frontal e hipocampo foram coletadas, congeladas em isopentano refrigerado em gelo seco e armazenadas em freezer - 80°C.

Determinação de proteínas

As dosagens de citocinas no soro e sobrenadantes de cultura estimuladas foram realizadas pelo método *Cytometric Bead Array* (CBA), utilizando-se os kits: *BD™ CBA Rat IL-1α Flex Set*, *BD™ CBA Rat IL-10 Flex Set* e *BD™ CBA Rat TNF Flex Set*. Os soros e os padrões de citocinas do kit foram incubados com microesferas de captura (capture beads) com anticorpos específicos para as respectivas citocinas e com o anticorpo de detecção marcado com ficoeritrina (PE). Após as incubações, foi acrescentado 1mL de solução de lavagem (*Wash Acquire*). Foi realizada a extração de proteínas para as dosagens. Os tecidos foram homogeneizados em 150 µL de tampão. As amostras foram centrifugadas durante 10 minutos a 1000 rpm. Foi descartado o sobrenadante e as amostras foram ressuspensas para as aquisições em citômetro de fluxo. Os resultados foram gerados em formato gráfico e tabular utilizando o *BD CBA Analysis Software*.

A concentração de proteínas totais no extrato obtido foi avaliada pelo método de Bradford (1976). A determinação de citocinas e BDNF foi realizada no Laboratório de Psiquiatria Molecular do Hospital de Clínicas de Porto Alegre – UFRGS.

Análise dos dados

Os dados foram analisados através do pacote estatístico SPSS 18.0 para Windows. A comparação entre os grupos foi feita a partir dos dados de cada protocolo. Assumiu-se $p < 0,05$ para as significâncias.

O protocolo LCE foi submetido à análise de variância (ANOVA) de uma via para o percentual de entradas e permanência nos braços abertos. Foi feita uma análise de componentes principais, para extrair 5 fatores relacionados à ansiedade e o comportamento de risco, conforme Cruz e colegas (1994).

Para considerar o nível de agressividade integrando as variáveis, utilizou-se a fórmula descrita por De Almeida e colegas (2007), a medida da agressão total: soma das frequências (mordida, postura lateral, pin e nip) com a duração (postura lateral e pins). A partir desta medida, os animais foram divididos em dois grupos: muito agressivos e pouco agressivos. Em uma análise, foram utilizados somente os dados dos três últimos dias do protocolo de agressividade, pois como a espécie Wistar é tipicamente agressiva, as primeiras interações poderiam ser consideradas treinamento e estímulo ao comportamento agressivo. Estas variáveis, no entanto, também foram submetidas à análise de variância de medidas repetidas para observar as alterações nos níveis de agressividade ao longo das sete exposições no protocolo intruso-residente.

Os dados bioquímicos que não apresentaram uma distribuição normal foram transformados (*transforming*) usando função logarítmica e a exclusão de *outliers* (utilizando critério visual de dispersão) para serem normalizados e com isso proceder a análise paramétrica nos resultados. Foram utilizadas duas fórmulas diferentes: $-1 * \text{Log}(y)$ para TNF- α e IL-10 para que não ficassem com resultados negativos e $\text{Ln}(y)$ para IL-1 α . Foi utilizado o teste de normalidade Shapiro-Wilk, confirmando a normalidade. Posteriormente, foi feita uma ANOVA de uma via com pós-teste de Dunnett, comparando os grupos apenas com o controle.

RESULTADOS

Ansiedade e exposição ao risco

Para análise do comportamento de ansiedade decorrente do labirinto em cruz elevado, foi feita uma análise fatorial, como propuseram Cruz e colegas (1994), com as frequências e os tempos de duração de cada comportamento, gerando 5 escores. A carga de cada parâmetro comportamental provê uma estimativa do quanto a variável reflete um fator; um valor de 1,0 indica reflexo perfeito, enquanto uma carga $<0,4$ indica um reflexo pobre. Os fatores extraídos dessa análise são independentes e refletem processos diferentes, explicando 84,9% da variância. A tabela 2 mostra o agrupamento das variáveis por fator.

O fator 1 agrega variáveis relacionadas a exposição a risco (tempo de permanência e número de entradas nos braços abertos, tempo de permanência e número de mergulhos). O fator 2 agrega variáveis relacionadas a *grooming*. O fator 3 diz respeito ao comportamento de esticar (avaliar risco). O fator 4 trata de comportamentos ansiosos, relacionados à permanência nos braços fechados. E o fator 5 agrupa duração e frequência do comportamento de erguer-se (*rearing*).

Tabela 2

Fatores para comportamentos no labirinto em cruz elevado

<i>Fator</i>	1	2	3	4	5
Duração braço aberto	0,968				
Frequencia braço aberto	0,917				
Frequencia mergulho	0,905				
Duração mergulho	0,872				
Duração braço fechado	-0,622	0,452			
Duração <i>grooming</i>		0,883			
Frequência <i>grooming</i>		0,876			
Duração quadrante central		-0,563	0,534		
Frequência esticar			0,856		
Duração esticar			0,839		
Frequência braço fechado				0,925	
Frequência quadrante central	0,543			0,802	
Duração erguer-se					0,923
Frequência erguer-se					0,858

Após normalizar e transformar os dados, os grupos foram comparados, através de ANOVA de uma via, utilizando os fatores como escores de ansiedade. No entanto, nenhuma

diferença foi estatisticamente significativa (fator 1, $F=1,09$ e $p=0,35$; fator 2, $F=1,63$ e $p=0,21$; fator 3, $F=0,19$ e $p=0,82$).

A partir do escore trabalhado por Cruz e colegas (1994), também foi feita uma ANOVA para avaliar as diferenças entre os grupos controle, A10 e A30, com o percentual de entradas ($F=2,04$; $p=0,14$) e o percentual de permanência no braço aberto ($F=1,04$; $p=0,36$), em relação à frequência total ($F=0,84$; $p=0,92$), porém não houve diferenças estatisticamente significativas.

Além das frequências e tempos de permanência, foi feita uma análise de variância para as variáveis de latência para a expressão dos comportamentos. Os dados das entradas no braço fechado ($F=0,46$; $p=0,63$), braço aberto ($F=2,38$; $p=0,11$) esticar ($F=1,07$; $p=0,35$), mergulho ($F=1,78$; $p=0,18$), *grooming* ($F=0,24$; $p=0,79$) e erguer-se ($F=0,98$; $p=0,38$), não foram estatisticamente significativos.

Agressividade

Para cálculo da agressividade, utilizando a fórmula descrita – soma das frequências (mordida, postura lateral, *pin* e *nip*) com a duração (postura lateral e *pins*) –, foram considerados somente os três últimos tempos. Os dados das variáveis que não tinham distribuição normal foram normalizados e estão descritos em média bruta, média com escore padronizado (escore Z), soma bruta e soma com escore Z na tabela 3. Estas diferenças não foram estatisticamente significativas.

Tabela 3

Escores a partir da fórmula da agressão total: soma das frequências (mordida, postura lateral, pin e nip) com a duração (postura lateral e pins)

Escores	Grupos M (DP)			Estatísticos	
	Controle (n=12)	A10 (n=12)	A30 (n=16)	F	p
Média de agressividade bruto	32,20 (12,40)	26,14 (9,92)	31,56 (11,81)	1,02	<,370
Média de agressividade escore Z	0,36 (3,54)	0,47 (3,24)	0,12 (3,03)	0,19	<,820
Soma de agressividade bruto	96,60 (37,22)	78,42 (29,76)	94,69 (35,43)	1,02	<,370
Soma de agressividade escore Z	0,36 (3,54)	0,47 (3,24)	0,12 (3,03)	0,1999	<,820

A partir dos níveis de agressividade, os animais foram divididos em dois grupos: mais agressivos e menos agressivos, pela média. Foram analisados se algum dos grupos A10, A30 e controle tinham mais animais agressivos, através de qui-quadrado, mas não houve significância.

Posteriormente, foi feita a análise de medidas repetidas, para os 7 tempos, utilizando a fórmula da agressividade em cada tempo. Não houve diferença estatística nesta análise.

Citocinas e BDNF

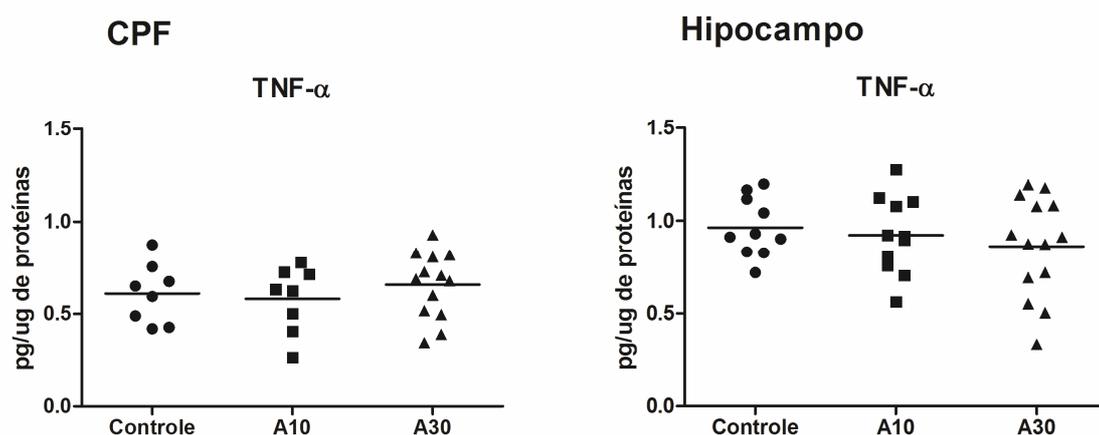
Os dados das variáveis IL-10, IL-1 α e TNF- α foram normalizados, uma vez que não havia distribuição normal, por meio de transformação logarítmica e exclusão de *outliers*. Através do teste de normalidade *Shapiro-Wilk*, confirmou-se que todas passaram a ter distribuição normal ($p>0,05$).

A presença do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) no córtex pré-frontal não demonstrou diferenças significativas entre os grupos (ANOVA), ($F=0,51$; $p=0,61$). As concentrações médias foram de 0,61 pg/ μ g (SD=0,16) no grupo controle; 0,58 pg/ μ g (SD=0,18) no grupo A10; e 0,66 pg/ μ g (SD=0,18) no grupo A30.

A concentração do TNF- α no hipocampo tampouco apresentou diferenças significativas entre os grupos (ANOVA), ($F=0,64$; $p=0,53$). As concentrações médias foram de 0,96 pg/ μ g (SD=0,16) no grupo controle; 0,92 pg/ μ g (SD=0,21) no grupo A10; e 0,86 pg/ μ g (SD=0,27) no grupo A30, conforme figura 3.

Figura 3

Concentração de TNF- α no córtex pré-frontal (CPF) e no hipocampo de animais controle (n=12) e de animais que tiveram administração de 1g/kg de álcool (A10, n=12) e de 3g/kg (A30, n=16)

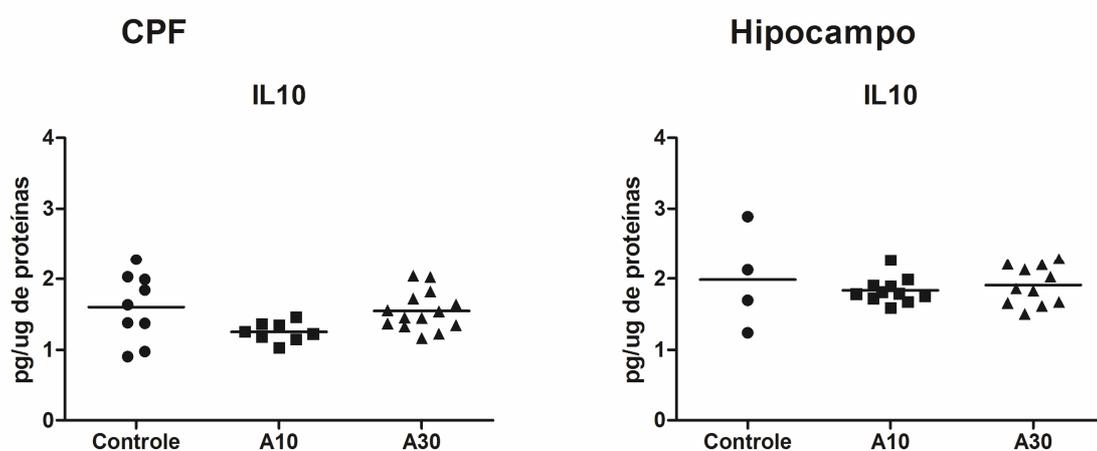


Para a variável IL-10 no córtex pré-frontal, foram encontradas concentrações médias de 1,60 pg/ μ g (SD=0,48) para o grupo controle; 1,25 pg/ μ g (SD=0,14) para o grupo A10; e 1,55 pg/ μ g (SD=0,27) para o grupo A30. No teste de diferença entre os grupos (ANOVA de uma via), o IL-10 no CPF não foi significativo, sendo $F=2,92$ ($p=0,07$).

Foi testada a diferença entre os três grupos através da ANOVA para a concentração IL-10 no hipocampo, a qual não foi significativa ($F=0,33$; $p=0,72$). As concentrações médias encontradas foram de $1,99 \text{ pg}/\mu\text{g}$ ($SD=0,70$) para o grupo controle; $1,84 \text{ pg}/\mu\text{g}$ ($SD=0,18$) para o grupo A10; e $1,91 \text{ pg}/\mu\text{g}$ ($SD=0,27$) para o grupo A30, conforme figura 4.

Figura 4

Concentração de IL-10 no córtex pré-frontal (CPF) e no hipocampo de animais controle (n=12) e de animais que tiveram administração de 1g/kg de álcool (A10, n=12) e de 3g/kg (A30, n=16)

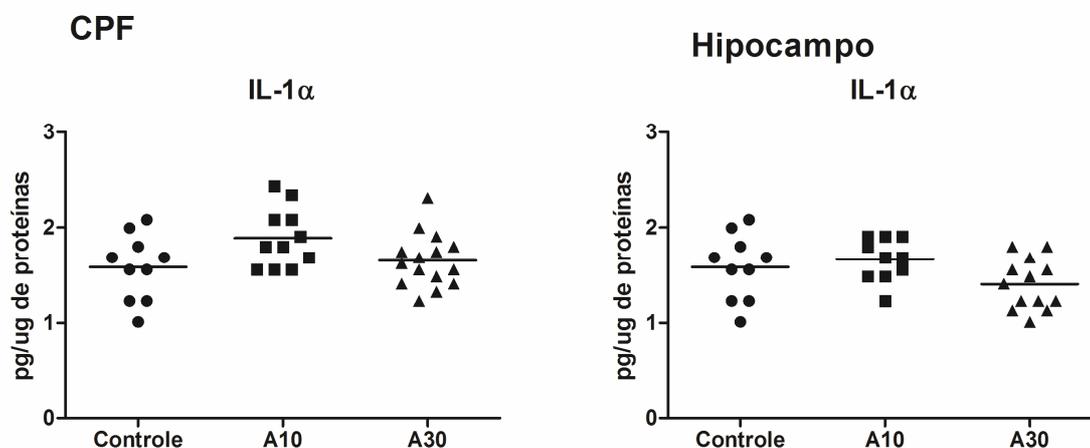


A presença da citocina IL-1 α no córtex pré-frontal não demonstrou diferenças significativas entre os grupos (ANOVA), $F=3,01$ ($p=0,06$). As concentrações médias foram de $1,58 \text{ pg}/\mu\text{g}$ ($SD=0,34$) no grupo controle; $1,89 \text{ pg}/\mu\text{g}$ ($SD=0,31$) no grupo A10; e $1,65 \text{ pg}/\mu\text{g}$ ($SD=0,28$) no grupo A30.

A concentração de IL-1 α no hipocampo tampouco apresentou diferenças significativas entre os grupos (ANOVA), $F=2,63$ ($p=0,09$). As concentrações médias foram de $1,59 \text{ pg}/\mu\text{g}$ ($SD=0,34$) no grupo controle; $1,66 \text{ pg}/\mu\text{g}$ ($SD=0,23$) no grupo A10; e $1,40 \text{ pg}/\mu\text{g}$ ($SD=0,26$) no grupo A30, conforme figura 5.

Figura 5

Concentração de IL-1 α no córtex pré-frontal (CPF) e no hipocampo de animais controle (n=12) e de animais que tiveram administração de 1g/kg de álcool (A10, n=12) e de 3g/kg (A30, n=16)

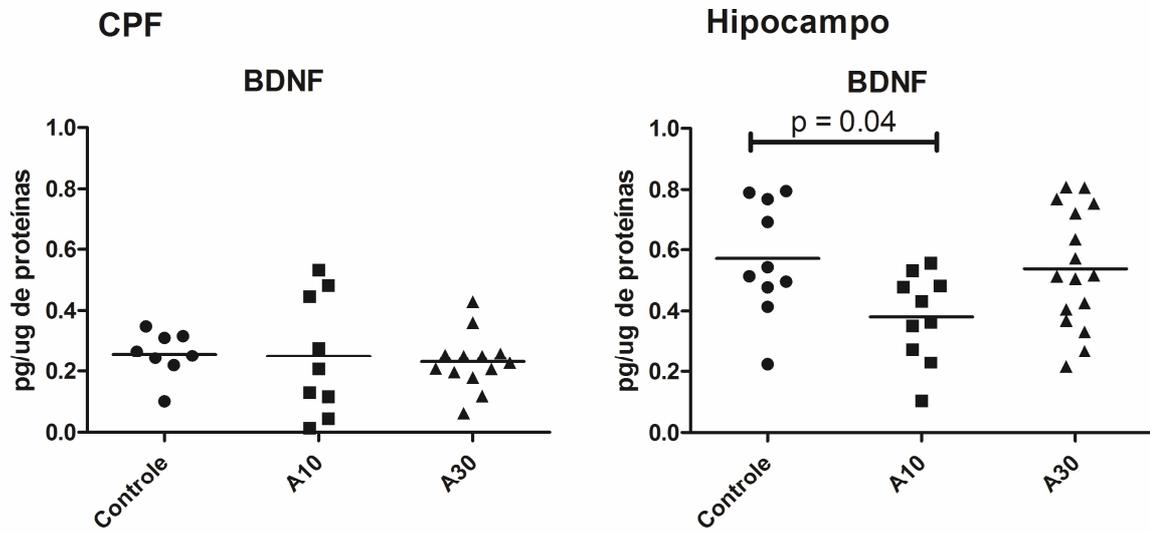


No córtex pré-frontal, as concentrações de BDNF tiveram as seguintes médias: 0,26 pg/ μ g (SD=0,08) no grupo controle; 0,25 pg/ μ g (SD=0,19) no grupo A10; e 0,23 pg/ μ g (SD=0,09) no grupo A30. Na ANOVA de uma via, a presença de BDNF no córtex pré-frontal não foi significativamente diferente entre os grupos, sendo $F=0,12$ ($p=0,89$).

Quanto à presença de BDNF no hipocampo, foram encontradas médias de 0,57 pg/ μ g (SD=0,19) no grupo controle; 0,38 pg/ μ g (SD=0,15) no grupo A10; e 0,54 pg/ μ g (SD=0,19) no grupo A30. A análise da ANOVA para a concentração de BDNF no hipocampo teve uma diferença significativa entre os grupos, $F=3,32$ ($p=0,048$). O teste pos-hoc *Dunnnett* mostra que esta diferença está entre o grupo controle em relação ao A10 (média=0,19), porém não quanto ao grupo controle em relação ao A30 (média=0,03). Portanto, houve níveis significativamente maiores de BDNF no hipocampo dos animais do grupo controle (0,57 pg/ μ g) do que no A10 (0,38 pg/ μ g), porém não em relação ao A30 (0,54 pg/ μ g), conforme figura 6.

Figura 6

Concentração de BDNF no córtex pré-frontal (CPF) e no hipocampo de animais controle ($n=12$) e de animais que tiveram administração de 1g/kg de álcool (A10, $n=12$) e de 3g/kg (A30, $n=16$)



DISCUSSÃO

O presente estudo investigou a relação entre o uso de álcool na adolescência e comportamentos ansiosos e agressivos na idade adulta, bem como a atividade inflamatória no SNC. Para testar os dados relativos à ansiedade provenientes do LCE, foi feita uma ANOVA tanto com as variáveis individualmente, como com fatores provenientes da análise fatorial, testando as diferenças entre os grupos. Os dados encontrados indicaram que não houve alteração de comportamento quanto às variáveis de exposição ao risco e ansiedade, utilizando as concentrações de álcool nas administrações por gavagem durante a adolescência.

Ainda no escopo da avaliação comportamental, foi realizado o cálculo da agressividade, procurando agregar as diversas variáveis em um escore único. Para isso foi utilizada a fórmula de soma das frequências para os comportamentos de mordida, postura lateral, *pin* e *nip* com a duração dos comportamentos de postura lateral e *pins*. Os dados foram descritos em média e soma com escore padronizado (escore Z). Os sujeitos foram então divididos entre mais e menos agressivos e comparados através de qui-quadrado. Além disso, foi realizada uma análise de medidas repetidas para os sete episódios de interação com os intrusos. Nenhum desses resultados foi estatisticamente significativo.

Um possível motivo pelo qual a hipótese inicial não foi corroborada é que a administração de álcool foi feita em um período em que possivelmente a droga não seja tão nociva às áreas cerebrais vinculadas à ansiedade e ao comportamento de risco. Costuma-se trabalhar com o estabelecimento da faixa etária da adolescência em ratos entre os 28 e os 42 DPN. Este protocolo realizou a gavagem entre os 30 e 46 DPN. No entanto, utilizou intervalos entre-doses de um a dois dias, o que talvez tenha caracterizado uma frequência baixa de administração de álcool.

A quantidade de etanol administrada varia para cada protocolo. Crews e Nixon (2009) chegam a propor um modelo de *binge drinking* que utilize 9g/kg/dia de etanol, embora admitam que 5g/kg/dia cause significativa intoxicação. Entretanto, no presente experimento, houve um cuidado quanto à segurança dos animais, levando em conta a hepatotoxicidade e outros possíveis efeitos paralelos do álcool e a escolha de 3g/kg para a reprodução do *binge drinking* pareceu mais adequada. É importante considerar, no entanto, que esta escolha talvez não tenha sido suficiente para causar efeitos mais prolongados e profundos no sistema nervoso central.

Outra explicação para a ausência de significância estatística nos achados é que a administração do etanol por gavagem em vez de injeção intraperitoneal (Pascual et al., 2007) pode ter gerado menor biodisponibilidade (Walker & Ehlers, 2009) e conseqüentemente ter

sido insuficiente para gerar alterações fisiológicas nas estruturas relacionadas ao comportamento ansioso e de exposição ao risco, como o córtex pré-frontal (Casey & Jones, 2010).

Um dos maiores problemas em desenvolver um modelo de comportamento de beber em roedores segundo McBride e colegas (2005) é que a maior parte dos roedores não consome etanol pronta e voluntariamente sem manipulações experimentais. Os pesquisadores acrescentam que por causa da janela de desenvolvimento relativamente estreita que caracteriza a adolescência nos animais, é muito difícil estabelecer os mecanismos subjacentes ao comportamento de beber adolescente e suas conseqüências de longo prazo. No presente estudo, muito tempo se passou entre a administração do etanol por gavagem e a quantificação de proteínas. Uma possível explicação para a ausência de resultados nas citocinas das estruturas é a presença de variáveis intervenientes que não puderam ser controladas no experimento.

Quanto à medida da atividade inflamatória, foram quantificadas as proteínas para as variáveis IL-10, IL-1 α e TNF- α tanto no hipocampo quanto no CPF. Foram descritas as concentrações médias das citocinas para cada grupo experimental e as diferenças foram testadas através de ANOVA. Mais uma vez, nenhuma dessas diferenças foram estatisticamente significativas.

O dado mais significativo neste estudo foi a diminuição da concentração do BDNF no hipocampo dos ratos expostos à dosagem intermediária de etanol no período da adolescência (1g/kg; 2ml/100g) em comparação ao grupo controle. Sabe-se que o BDNF tem sido considerado um regulador de desenvolvimento, plasticidade e mesmo o comportamento de adição (Davis, 2008). A literatura aponta para o possível envolvimento da atividade neurotrófica diminuída com a neurodegeneração induzida pelo etanol no cérebro adulto e na etiologia dos transtornos desenvolvimentais relacionados ao álcool (Moonat, Starkman, Sakharkar, & Pandey, 2009). Isso acontece através da diminuição da expressão do BDNF ou da inabilidade do receptor em traduzir sinais na presença do etanol (Davis, 2008).

O BDNF também foi relacionado às respostas ao álcool. Por exemplo, o estudo de Kerns e colegas (2005) demonstrou que os níveis de BDNF no núcleo accumbens aumentaram depois de exposição aguda ao álcool em camundongos que ingerem baixas quantidades (*low-drinking DBA/2J mice*), mas não nos que consomem altos níveis de álcool (*C57BL/6 mice*). Este resultado aponta no sentido contrário ao achado do presente estudo, pois os dados bioquímicos e comportamentais implicam a sinalização de BDNF como um importante fator nas respostas comportamentais ao uso agudo do etanol, porém caracterizando aumento e não diminuição nas doses baixas de consumo de álcool.

Por outro lado, estudos demonstraram que tratamento crônico com etanol em ratos diminuem a expressão de BDNF no hipocampo e no córtex (John MacLennan, Leea, & Walker, 1995). O presente estudo corroborou com esse dado somente na dosagem mais branda. Uma possível interpretação desse dado é que os processos inflamatórios que estariam presentes na dosagem maior teriam estimulado a produção de BDNF posteriormente à administração de etanol, em vez da diminuição. Janak e colegas, em uma revisão (2006), demonstraram que em conjunto vários estudos indicam que o BDNF pode ter a função de regular o consumo do álcool. O BDNF parece agir com um regulador negativo dos comportamentos relacionados ao álcool.

Os resultados quanto ao envolvimento do BDNF no uso do álcool não são conclusivos e possuem muitas lacunas. Os fatores de neurotrofina parecem ser importantes defesas do sistema nervoso contra efeitos farmacológicos do álcool no comportamento, embora a ação farmacológica específica do álcool e os circuitos específicos do sistema nervoso que são regulados variam (Janak et al., 2006).

CAPÍTULO III

CONCLUSÃO

A presente dissertação problematizou o uso do álcool no período de desenvolvimento da adolescência, cuja forma de consumo mais prevalente é de quantidades grandes num curto espaço de tempo, o chamado *binge drinking* (Squeglia et al., 2011). O desenho experimental desenvolvido teve por objetivo testar se haveria correlação entre este hábito de beber durante a adolescência e alterações comportamentais quanto às variáveis ansiedade e agressividade na adultez. A hipótese baseada na literatura era de que os parâmetros testados aumentariam nos animais que consumiram doses maiores de etanol.

Além dos testes comportamentais, esta dissertação também apresentou análises bioquímicas, em que foram quantificadas citocinas pró (TNF- α) e anti-inflamatórias (IL-1 α e IL-10) e BDNF nas estruturas córtex pré-frontal e hipocampo. Apesar de a literatura apontar ainda muitas lacunas e incertezas quanto à atividade inflamatória do SNC (Davis, 2008), partiu-se da hipótese de que quanto mais alta a dose de álcool administrada, maior presença de citocinas pró-inflamatórias e menor quantidade de citocinas anti-inflamatórias e de BDNF, que seria um indicador de atividade de neurogênese e neuroplasticidade.

A literatura sugere que o uso de álcool na adolescência está associado com uma série de problemas como desempenho inferior em tarefas relacionadas às funções executivas, alterações nas estruturas cerebrais, processos inflamatórios e transtornos comportamentais que se perpetuam na vida adulta, como níveis mais altos de ansiedade e agressividade (Cook, 1998). Muitos mecanismos envolvidos nesse processo não estão bem esclarecidos e permanece, por exemplo, a dúvida se a recuperação da integridade cerebral e da função cognitiva é mais fácil na juventude, dada a maior plasticidade cerebral ou se, ao contrário, a neurotoxicidade afeta de tal forma prejudicando o curso neuromaturacional tornando a recuperação menos provável (Witt, 2010).

O experimento reuniu destarte variáveis diversas que poderiam interagir e trazer contribuições importantes para os estudos dessa área. Como foi observado, entretanto, os protocolos não foram capazes de identificar diferenças significativas quanto às alterações comportamentais, tendo sido possível discutir alguns motivos prováveis desta ausência de resultados. Com relação à atividade bioquímica, o resultado mais expressivo foi a diminuição significativa de BDNF no hipocampo para os animais que receberam a dosagem intermediária de etanol, porém esta diferença não foi encontrada para a dosagem maior.

Espera-se que o presente trabalho possa contribuir para novas pesquisas relacionadas ao tema do uso do álcool na adolescência, especialmente o *binge drinking*, para que se compreendam melhor as alterações comportamentais e bioquímicas decorrentes do uso. Sugere-se que novos estudos sejam realizados, incluindo outros protocolos experimentais e análises de outros marcadores inflamatórios e estruturas cerebrais.

REFERÊNCIAS

- De Almeida, R. M. M., Benini, Q., Betat, J. S., Hipólido, D. C., Miczek, K. A., & Svensson, A. I. (2007). Heightened aggression after chronic flunitrazepam in male rats: potential links to cortical and caudate–putamen-binding sites. *Psychopharmacology*, *197*(2), 309–318. doi:10.1007/s00213-007-1031-5
- Andersen, S. L., Tomada, A., Vincow, E. S., Valente, E., Polcari, A., & Teicher, M. H. (2008). Preliminary Evidence for Sensitive Periods in the Effect of Childhood Sexual Abuse on Regional Brain Development. *Journal of Neuropsychiatry*, *20*, 292–301. doi:10.1176/appi.neuropsych.20.3.292
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, *72*(1), 248–254.
- Brown, S. A., & Tapert, S. F. (2004). Adolescence and the Trajectory of Alcohol Use: Basic to Clinical Studies. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1021*(1), 234–244. doi:10.1196/annals.1308.028
- Casey, B. J., & Jones, R. M. (2010). Neurobiology of the adolescent brain and behavior: implications for substance use disorders. *Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry*, *49*(12), 1189–1201.
- Collins, M. A., & Neafsey, E. J. (2011). Neuroinflammatory Pathways in Binge Alcohol-Induced Neuronal Degeneration: Oxidative Stress Cascade Involving Aquaporin, Brain Edema, and Phospholipase A2 Activation. *Neurotoxicity Research*, *21*(1), 70–78. doi:10.1007/s12640-011-9276-5
- Cook, R. T. (1998). Alcohol Abuse, Alcoholism, and Damage to the Immune System—A Review. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, *22*(9), 1927–1942. doi:10.1111/j.1530-0277.1998.tb05900.x

- Crews, F., He, J., & Hodge, C. (2007). Adolescent cortical development: A critical period of vulnerability for addiction. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *86*(2), 189–199. doi:10.1016/j.pbb.2006.12.001
- Crews, F. T., Mdzinarishvili, A., Kim, D., He, J., & Nixon, K. (2006). Neurogenesis in adolescent brain is potently inhibited by ethanol. *Neuroscience*, *137*(2), 437–445. doi:10.1016/j.neuroscience.2005.08.090
- Crews, F. T., & Nixon, K. (2009). Mechanisms of Neurodegeneration and Regeneration in Alcoholism. *Alcohol and Alcoholism*, *44*(2), 115–127. doi:10.1093/alcalc/agn079
- Cruz, A. P. M., Frei, F., & Graeff, F. G. (1994). Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *49*(1), 171–176. doi:10.1016/0091-3057(94)90472-3
- Dahl, R. E. (2004). Adolescent Brain Development: A Period of Vulnerabilities and Opportunities. Keynote Address. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1021*(1), 1–22. doi:10.1196/annals.1308.001
- Davis, M. I. (2008). Ethanol–BDNF interactions: Still more questions than answers. *Pharmacology & Therapeutics*, *118*(1), 36–57. doi:10.1016/j.pharmthera.2008.01.003
- Doremus-Fitzwater, T. L., Varlinskaya, E. I., & Spear, L. P. (2010). Motivational systems in adolescence: Possible implications for age differences in substance abuse and other risk-taking behaviors. *Brain and Cognition*, *72*(1), 114–123. doi:10.1016/j.bandc.2009.08.008
- Englund, M. M., Egeland, B., Oliva, E. M., & Collins, W. A. (2008). Childhood and adolescent predictors of heavy drinking and alcohol use disorders in early adulthood: a longitudinal developmental analysis. *Addiction*, *103*(s1), 23–35. doi:10.1111/j.1360-0443.2008.02174.x

- Exum, M. L. (2006). Alcohol and aggression: An integration of findings from experimental studies. *Journal of Criminal Justice*, 34(2), 131–145. doi:10.1016/j.jcrimjus.2006.01.008
- Fergusson, D. M., Horwood, L. J., & Ridder, E. M. (2007). Conduct and attentional problems in childhood and adolescence and later substance use, abuse and dependence: Results of a 25-year longitudinal study. *Drug and Alcohol Dependence*, 88, S14–S26. doi:10.1016/j.drugalcdep.2006.12.011
- Frankfort-Nachmias, C. (2008). *Research Methods in the Social Sciences* (7th ed.). New York, NY: Worth Publishers.
- Goncharova, L. B., & Tarakanov, A. O. (2007). Molecular networks of brain and immunity. *Brain Research Reviews*, 55(1), 155–166. doi:10.1016/j.brainresrev.2007.02.003
- Hingson, R., Heeren, T., & Zakocs, R. (2001). Age of Drinking Onset and Involvement in Physical Fights After Drinking. *Pediatrics*, 108(4), 872–877. doi:10.1542/peds.108.4.872
- Hingson, R. W. (2006). Age at Drinking Onset and Alcohol Dependence: Age at Onset, Duration, and Severity. *Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine*, 160(7), 739. doi:10.1001/archpedi.160.7.739
- Janak, P. H., Wolf, F. W., Heberlein, U., Pandey, S. C., Logrip, M. L., & Ron, D. (2006). BIG News in Alcohol Addiction: New Findings on Growth Factor Pathways BDNF, Insulin, and GDNF. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 30(2), 214–221. doi:10.1111/j.1530-0277.2006.00026.x
- John MacLennan, A., Leea, N., & Walker, D. W. (1995). Chronic ethanol administration decreases brain-derived neurotrophic factor gene expression in the rat hippocampus. *Neuroscience Letters*, 197(2), 105–108.
- Johnston, A. L., & File, S. E. (1991). Sex differences in animal tests of anxiety. *Physiology & Behavior*, 49(2), 245–250. doi:10.1016/0031-9384(91)90039-Q

- Kapczynski, F., Frey, B. N., Kauer-Sant'Anna, M., & Grassi-Oliveira, R. (2008). Brain-derived neurotrophic factor and neuroplasticity in bipolar disorder. *Expert Review of Neurotherapeutics*, 8(7), 1101–1113. doi:10.1586/14737175.8.7.1101
- Kellam, S. (1980). Mental health in first grade and teenage drug, alcohol, and cigarette use. *Drug and Alcohol Dependence*, 5(4), 273–304. doi:10.1016/0376-8716(80)90003-4
- Kerns, R. T. (2005). Ethanol-Responsive Brain Region Expression Networks: Implications for Behavioral Responses to Acute Ethanol in DBA/2J versus C57BL/6J Mice. *Journal of Neuroscience*, 25(9), 2255–2266. doi:10.1523/JNEUROSCI.4372-04.2005
- Little, P. J., Kuhn, C. M., Wilson, W. A., & Swartzwelder, H. S. (1996). Differential Effects of Ethanol in Adolescent and Adult Rats. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 20(8), 1346–1351. doi:10.1111/j.1530-0277.1996.tb01133.x
- Maggs, J. L., & Schulenberg, J. E. (2005). Initiation and course of alcohol consumption among adolescents and young adults. *Recent Developments in Alcoholism* (p. 29–47). Springer.
- McBride, W. J., Bell, R. L., Rodd, Z. A., Strother, W. N., & Murphy, J. M. (2005). Adolescent alcohol drinking and its long-range consequences. *Recent Developments in Alcoholism* (p. 123–142). Springer.
- McGue, M., Iacono, W. G., Legrand, L. N., Malone, S., & Elkins, I. (2001). Origins and Consequences of Age at First Drink. I. Associations With Substance-Use Disorders, Disinhibitory Behavior and Psychopathology, and P3 Amplitude. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 25(8), 1156–1165. doi:10.1111/j.1530-0277.2001.tb02330.x
- Miczek, K. A. (1979). A new test for aggression in rats without aversive stimulation: Differential effects of d-amphetamine and cocaine. *Psychopharmacology*, 60, 253–259. doi:10.1007/BF00426664

- Molina, B. S. (2005). High Risk Adolescent and Young Adult Populations: Consumption and Consequences. *Recent developments in alcoholism* (p. 49–65). Springer.
- Moonat, S., Starkman, B. G., Sakharkar, A., & Pandey, S. C. (2009). Neuroscience of alcoholism: molecular and cellular mechanisms. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *67*(1), 73–88. doi:10.1007/s00018-009-0135-y
- Moore, K. W., O'Garra, A., Malefyt, R. W., Vieira, P., & Mosmann, T. R. (1993). Interleukin-10. *Annual Review of Immunology*, *11*(1), 165–190. doi:10.1146/annurev.iy.11.040193.001121
- Pascual, M., Blanco, A. M., Cauli, O., Miñarro, J., & Guerri, C. (2007). Intermittent ethanol exposure induces inflammatory brain damage and causes long-term behavioural alterations in adolescent rats. *European Journal of Neuroscience*, *25*(2), 541–550. doi:10.1111/j.1460-9568.2006.05298.x
- Perry, C. L., Williams, C. L., Komro, K. A., Veblen-Mortenson, S., Forster, J. L., Bernstein-Lachter, R., Pratt, L. K., et al. (2000). Project Northland High School Interventions: Community Action to Reduce Adolescent Alcohol Use. *Health Education & Behavior*, *27*(1), 29–49. doi:10.1177/109019810002700105
- Rettori, V., Fernandez-Solari, J., Prestifilippo, J. P., Mohn, C., De Laurentiis, A., Bornstein, S. R., Ehrhart-Bornstein, M., et al. (2007). Endocannabinoids in TNF-alpha and Ethanol Actions. *Neuroimmunomodulation*, *14*(3-4), 188–192. doi:10.1159/000110645
- Robert, G., Drapier, D., Bentué-Ferrer, D., Renault, A., & Reymann, J.-M. (2011). Acute and chronic anxiogenic-like response to fluoxetine in rats in the elevated plus-maze: Modulation by stressful handling. *Behavioural Brain Research*, *220*(2), 344–348. doi:10.1016/j.bbr.2011.01.051
- Semenova, S. (2011). Attention, impulsivity, and cognitive flexibility in adult male rats exposed to ethanol binge during adolescence as measured in the five-choice serial

- reaction time task: the effects of task and ethanol challenges. *Psychopharmacology*. doi:10.1007/s00213-011-2458-2
- Spear, L. P. (2000). The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 24(4), 417–463. doi:10.1016/S0149-7634(00)00014-2
- Spear, L. P. (2004). Adolescent Brain Development and Animal Models. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1021(1), 23–26. doi:10.1196/annals.1308.002
- Spear, L. P., & Varlinskaya, E. I. (2005). Adolescence. In M. Galanter, C. Lowman, G. M. Boyd, V. B. Faden, E. Witt, & D. Lagressa (Orgs.), *Recent Developments in Alcoholism* (Vol. 17, p. 143–159). New York: Kluwer Academic Publishers-Plenum Publishers.
- Squeglia, L. M., Schweinsburg, A. D., Pulido, C., & Tapert, S. F. (2011). Adolescent Binge Drinking Linked to Abnormal Spatial Working Memory Brain Activation: Differential Gender Effects. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 35(10), 1831–1841. doi:10.1111/j.1530-0277.2011.01527.x
- Stansfield, K. H., & Kirstein, C. L. (2007). Chronic cocaine or ethanol exposure during adolescence alters novelty-related behaviors in adulthood. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 86(4), 637–642. doi:10.1016/j.pbb.2007.02.008
- Stoppel, C., Albrecht, A., Pape, H.-C., & Stork, O. (2006). Genes and neurons: molecular insights to fear and anxiety. *Genes, Brain and Behavior*, 5, 34–47. doi:10.1111/j.1601-183X.2006.00229.x
- Toledo-Rodriguez, M., & Sandi, C. (2011). Stress during Adolescence Increases Novelty Seeking and Risk-Taking Behavior in Male and Female Rats. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 5. doi:10.3389/fnbeh.2011.00017

- Veenema, A. H., & Neumann, I. D. (2007). Neurobiological Mechanisms of Aggression and Stress Coping: A Comparative Study in Mouse and Rat Selection Lines. *Brain, Behavior and Evolution*, 70(4), 274–285. doi:10.1159/000105491
- Vitkovic, L., Konsman, J. P., Bockaert, J., Dantzer, R., Homburger, V., & Jacque, C. (2000). Cytokine signals propagate through the brain. *Molecular psychiatry*, 5(6), 604–615.
- Wahlstrom, D., Collins, P., White, T., & Luciana, M. (2010). Developmental changes in dopamine neurotransmission in adolescence: Behavioral implications and issues in assessment. *Brain and Cognition*, 72(1), 146–159. doi:10.1016/j.bandc.2009.10.013
- Walf, A. A., & Frye, C. A. (2007). The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nature Protocols*, 2(2), 322–328. doi:10.1038/nprot.2007.44
- Walker, B. M., & Ehlers, C. L. (2009). Age-related differences in the blood alcohol levels of Wistar rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 91(4), 560–565. doi:10.1016/j.pbb.2008.09.017
- Ward, R. J., Colivicchi, M. A., Allen, R., Schol, F., Lallemand, F., de Witte, P., Ballini, C., et al. (2009). Neuro-inflammation induced in the hippocampus of “binge drinking” rats may be mediated by elevated extracellular glutamate content. *Journal of Neurochemistry*, 111(5), 1119–1128. doi:10.1111/j.1471-4159.2009.06389.x
- Witt, E. D. (2010). Research on alcohol and adolescent brain development: opportunities and future directions. *Alcohol*, 44(1), 119–124. doi:10.1016/j.alcohol.2009.08.011
- Yap, J. J., & Miczek, K. A. (2007). Social defeat stress, sensitization, and intravenous cocaine self-administration in mice. *Psychopharmacology*, 192, 261–273. doi:10.1007/s00213-007-0712-4
- You, Z., Luo, C., Zhang, W., Chen, Y., He, J., Zhao, Q., Zuo, R., et al. (2011). Pro- and anti-inflammatory cytokines expression in rat’s brain and spleen exposed to chronic mild

stress: Involvement in depression. *Behavioural Brain Research*, 225(1), 135–141.

doi:10.1016/j.bbr.2011.07.006

ANEXOS

Carta de aprovação no comitê de ética no uso de animais da UFRGS

Sistema Pesquisa - Pesquisador: Lisiane Bizarro Araujo

Projeto Nº: 21377

Título: EFEITOS DA EXPOSICAO AO ETANOL NA ADOLESCENCIA SOBRE A ATENCAO, IMPULSIVIDADE E AGRESSIVIDADE DE RATOS WISTAR_LPNEC

COMISSAO DE ETICA NO USO DE ANIMAIS: Parecer

Parecer Reunião 15/08/2011

Projeto 21377 - EFEITOS DA EXPOSICAO AO ETANOL NA ADOLESCENCIA SOBRE A ATENCAO, IMPULSIVIDADE E AGRESSIVIDADE DE RATOS WISTAR_LPNEC

Projeto de pesquisa: "EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO ETANOL NA ADOLESCÊNCIA SOBRE A ATENÇÃO, IMPULSIVIDADE E AGRESSIVIDADE DE RATOS WISTAR"

Coordenador: Profa. Dra. Lisiane Bizarro Araujo.

As questões foram respondidas.

Ressalta-se que a empresa responsável pela coleta de rejeitos biológicos da UFRGS não é mais a Aborgama, portanto, substituir no projeto o nome da empresa por "empresa terceirizada licitada pela UFRGS para coleta dos resíduos biológicos".

O projeto está aprovado.

CEUA/UFRGS