



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

**EFEITOS DA EXPOSIÇÃO CRÔNICA AO ETANOL DA  
ADOLESCÊNCIA À FASE ADULTA EM RATOS SOBRE O  
PROCESSO MNEMÔNICO E NA DENSIDADE CELULAR NO  
HIPOCAMPO**

**Maria Cristina Souza Pereira Oliveira**

Belém-PA

2012

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

**EFEITOS DA EXPOSIÇÃO CRÔNICA AO ETANOL DA  
ADOLESCÊNCIA À FASE ADULTA EM RATOS SOBRE O  
PROCESSO MNEMÔNICO E NA DENSIDADE CELULAR NO  
HIPOCAMPO**

Autor: Maria Cristina Pereira Oliveira.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Cristiane do Socorro  
Ferraz Maia.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração: Fármacos e Medicamentos, do Instituto de Ciências de Saúde da Universidade Federal do Pará para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Belém-PA

2012

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Maria Cristina Souza Pereira Oliveira

**Efeitos da exposição crônica ao etanol da adolescência à fase adulta em ratos sobre o processo mnemônico e na densidade celular no hipocampo**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração: Fármacos e Medicamentos, do Instituto de Ciências de Saúde da Universidade Federal do Pará para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora

---

**Dra. Cristiane do Socorro Ferraz Maia (UFPA)**

Banca examinadora:

---

**Dra. Carolina Heitmann Mares Azevedo Ribeiro (UFPA)**

---

**Dr. Rafael Rodrigues Lima (UFPA)**

Aprovado em: 30 de Novembro de 2012

Primeiramente a Deus por permitir estar aqui neste momento.  
À minha família, em especial minha mãe Osmarina Souza, meu pai Edwardo Pereira  
(in memorian).  
Ao meu querido esposo, Joelson Oliveira; filho Vinícius Edwardo Oliveira pelo apoio  
incondicional, pela compreensão nos momentos de ausência;  
E a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para este momento.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente ao meu Deus poderoso, provedor da minha vida. A Ele que esteve presente nos momentos de alegria e vitória e, que nos momentos de dificuldade e desânimo, carregou-me, levantou-me e ergueu-me. A Ele toda honra e glória ontem, hoje e sempre. Obrigado Senhor!

Aos meus irmãos e sobrinhos, em especial Rodrigo Pereira e minha flor e guerreira Sofia Lorena Pereira pela força e apoio de sempre.

A orientadora prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>, Cristiane do S. F. Maia que da sua maneira sempre me incentivou a continuar, obrigada pela orientação, paciência e compreensão nesses meses de convivência.

Ao prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> Rafael Rodrigues Lima pelo incentivo inicial desta etapa da minha vida, por proporcionar grande aprendizagem na vida acadêmica e pessoal, muito obrigado!

Àos meus amigos em especial Gedeão Oliveira, pela ajuda, apoio e compreensão de sempre e por me mostrar o lado divertido dessa caminhada. A Sabrina de Carvalho, Josiane Silva, Rui Guilherme, Elder Monteiro, Luana Fernandez e demais colegas que contribuíram para realização deste trabalho. Sou muito grata a vocês!

Aos professores de um modo geral pelo ato de ensinar e que fizeram parte desta conquista.

Aos colegas de turma, que juntos vivenciamos e superamos as mudanças e desafios a nós apresentados e pelos momentos de descontração e apoio proporcionados.

A agência financiadora FAPESPA.

De tudo ficam três coisas:

A certeza de que estamos sempre começando,

A certeza de que é preciso continuar,

E a certeza de que podemos ser interrompidos antes de terminar.

Fazer da interrupção um caminho novo.

Da queda um passo de dança.

Do medo uma escada.

Do sonho uma ponte.

Da procura um encontro.

Fernando Pessoa.

## RESUMO

### EFEITOS DA EXPOSIÇÃO CRÔNICA AO ETANOL DA ADOLESCÊNCIA À FASE ADULTA EM RATOS SOBRE O PROCESSO MNEMÔNICO E NA DENSIDADE CELULAR NO HIPOCAMPO

O sistema nervoso central é vulnerável a ação de inúmeras substâncias, dentre estas se encontram as substâncias psicoativas, tal como o álcool etílico ou etanol, que é consumida pela humanidade há bastante tempo e está associado a uma gama de problemas médico sociais. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi investigar as alterações neurocomportamentais e teciduais decorrentes da exposição ao etanol da adolescência à fase adulta sobre o hipocampo. Para isto, foram avaliadas 30 ratas *Wistar*, distribuídas em grupo controle e etanol, que ao completarem 35 dias de idade (adolescência) receberam, por gavagem, etanol na dose de 6,5 g/Kg/dia até completar 90 dias (fase adulta). Após esse período, os animais foram submetidos aos ensaios comportamentais do campo aberto, reconhecimento social e a esQUIVA inibitória e posteriormente perfundidos para avaliação tecidual através de processamento histológico por violeta de cresila. Foram coletadas e processadas secções de 50 µm, as amostras foram submetidas à coloração por violeta de cresila. Os resultados demonstraram déficit nos parâmetros analisados nos ensaios comportamentais, como comprometimento na deambulação natural do animal, no percentual no número de quadrantes centrais e tempo na área central o que sugere comportamento do tipo ansiogênico, aumento no número de levantamentos relacionado à atividade exploratória dos animais. Observou-se comprometimento no desenvolvimento de processos mnemônicos com diminuição na retenção de memória de curto e longo prazo, bem como na de reconhecimento social. Quanto ao tratamento histológico foi observado diminuição na densidade celular nas regiões CA1 e CA3 do hipocampo. Estes resultados indicam que a exposição crônica ao etanol da adolescência a fase adulta perturba aspectos comportamentais relacionados ao sistema límbico, no qual o hipocampo esta inserido.

Palavras- Chave: Etanol, comportamento, sistema límbico, hipocampo, memória.

## **ABSTRACT**

### **EFFECTS OF CHRONIC EXPOSURE TO ETHANOL FROM ADOLESCENCE TO PHASE IN ADULT RATS ON THE PROCESS MNEMONIC AND DENSITY IN MOBILE HIPPOCAMPUS**

The central nervous system is vulnerable to the action of several substances including these are psychoactive substances such as ethyl alcohol or ethanol, which is consumed by mankind for a long time and is associated with a range of medical social problems. Therefore, the objective of this study was to investigate the neurobehavioral alterations and tissue from exposure to ethanol from adolescence to adulthood on the hippocampus. For this, 30 Wistar rats were evaluated distributed into control and ethanol, which upon reaching 35 days of age (adolescence) received by gavage ethanol at a dose of 6.5 g/Kg/day for 90 days (adulthood ). After this period, the animals were subjected to behavioral tests of open field, social recognition and avoidance for evaluation and subsequently perfused tissue through histological processing by violet cresila. Were collected and processed sections of 50  $\mu\text{m}$ , the samples were subjected to staining violet cresila. The results demonstrate a deficit in the parameters measured in the behavioral assays such as impairment in natural ambulation of the animal, the percentage of the number of quarters and time in the central core area which suggests anxiogenic-like behavior, increase in exploratory activity surveying related to animal. Observed impairment in the development of mnemonic processes with reduced memory retention of short and long term as well as in social recognition. Regarding the treatment histologically observed decrease in cell density in CA1 and CA3 regions of the hippocampus. These results indicate that chronic exposure to ethanol from adolescence to adulthood disrupts behavioral aspects related to the limbic system, the hippocampus where it entered.

Keywords: Ethanol, behavior, limbic system, hippocampus, memory.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Representação da população celular do SNC.....	20
<b>Figura 2</b>	Arquitetura anatômica do sistema límbico.....	22
<b>Figura 3</b>	Estrutura do hipocampo comparada ao cavalo marinho.....	22
<b>Figura 4</b>	Representação do hipocampo de rato, primata não-humano e humano.....	23
<b>Figura 5</b>	Camadas fundamentais do hipocampo.....	24
<b>Figura 6</b>	Estruturas envolvidas na memória.....	25
<b>Figura 7</b>	Esquema da LTP que ocorre em diversas regiões do SNC.....	27
<b>Figura 8</b>	Representação esquemática da memória.....	29
<b>Figura 9</b>	Esquema de tratamento dos grupos experimentais.....	35
<b>Figura 10</b>	Representação esquemática do campo aberto.....	36
<b>Figura 11</b>	Representação esquemática do teste de reconhecimento social.....	38
<b>Figura 12</b>	Esquiva passiva do tipo <i>step-down</i> .....	39
<b>Figura 13</b>	Esquema do teste para avaliação de memória.....	40
<b>Figura 14</b>	Esquema de procedimentos adotados nesta investigação.....	41
<b>Figura 15</b>	Procedimento de perfusão.....	42
<b>Figura 16</b>	Representação esquemática do hipocampo.....	43
<b>Figura 17</b>	Esquema de contagem de corpos celulares em CA1 e CA3 do hipocampo.....	44
<b>Figura 18</b>	Efeito da exposição crônica ao EtOH no teste do campo aberto.....	47
<b>Figura 19</b>	Efeito da exposição crônica ao EtOH sobre a memória social.....	48
<b>Figura 20</b>	Efeito da exposição crônica ao EtOH sobre a MCD e MLD.....	49
<b>Figura 21</b>	Efeito da exposição crônica ao EtOH sobre a densidade celular de CA1 e CA3 do hipocampo.....	50

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HT <sub>3</sub>	Receptor de serotonina subtipo 3
AMPA	Ácido alfa-amino-3-hidroxil-5-metil-4-isoxazol-propiónico
CA	<i>Corno de Amon</i>
Ca <sup>2+</sup>	Íon cálcio
CEBRID	Centro brasileiro de informação sobre drogas psicotrópicas
EC	Estímulo condicionado
ENC	Estímulo não condicionado
EPM	Erro padrão da média
EtOH	Etanol
GABA <sub>A</sub>	Ácido gama-aminobutírico
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
K <sup>+</sup>	Íon potássio
LAC	América latina e Caribe
LB	Linha de base
LTD	Depressão de longa duração
LTP	Potenciação de longa duração
MCD	Memória de curta duração
MLD	Memória de longa duração
MS	Ministério da saúde
NMDA	N-metil-D-aspartato
OMS	Organização mundial da saúde
SNC	Sistema nervoso central

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
<b>1.1 Etanol: Considerações Gerais.....</b>	<b>15</b>
<b>1.2 EtOH e Sistema Nervoso Central.....</b>	<b>17</b>
<b>1.3 Áreas Neurais Afetadas pelo EtOH.....</b>	<b>19</b>
<b>1.4 Constituição do Tecido Nervoso.....</b>	<b>20</b>
<b>1.5 Sistema Límbico e Hipocampo.....</b>	<b>21</b>
<b>1.6 Bioquímica e Plasticidade Neuronal da Memória.....</b>	<b>25</b>
<b>1.7 Aprendizado e Memória.....</b>	<b>28</b>
<b>1.8 Tipos de Memória.....</b>	<b>29</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>31</b>
<b>2.1 Objetivo Geral.....</b>	<b>32</b>
<b>2.2 Ojetivos Específicos.....</b>	<b>32</b>
<b>3 MATERIAL e METÓDOS.....</b>	<b>33</b>
<b>3.1 Animais de Experimentação.....</b>	<b>34</b>
<b>3.2 Tratamento com EtOH.....</b>	<b>34</b>
<b>3.3 Ensaio Comportamentais.....</b>	<b>35</b>
3.3.1 CAMPO ABERTO.....	36
3.3.2 RECONHECIMENTO SOCIAL.....	37
3.3.3 ESQUIVA INIBITÓRIA.....	38
<b>3.4 Perfusão e Processamento Tecidual.....</b>	<b>41</b>
<b>3.5 Análise Histológica.....</b>	<b>43</b>
3.5.1 ANÁLISE QUANTITATIVA.....	44
<b>3.6 Análise Estatística.....</b>	<b>45</b>
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>46</b>
<b>4.1 Campo Aberto.....</b>	<b>47</b>
<b>4.2 Reconhecimento Social.....</b>	<b>48</b>
<b>4.3 Esquiva Inibitória.....</b>	<b>48</b>
<b>4.4 Alterações na Densidade Celular.....</b>	<b>49</b>
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>51</b>

<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>56</b>
<b>7 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>58</b>
<b>8 ANEXO.....</b>	<b>67</b>

---

# I INTRODUÇÃO

---

## 1.1 Etanol: Considerações Gerais

O consumo de bebidas alcoólicas pelo homem remonta os primórdios da história, tendo seus primeiros relatos por volta de 6.000 anos atrás, no Egito e Babilônia, sendo as bebidas fermentadas e de baixo teor alcoólico as mais consumidas naquela época. Posteriormente, na Idade Média, os Árabes introduziram na Europa a técnica de destilação com objetivo de aumentar o teor de etanol (EtOH) nas bebidas. Naquela época, acreditava-se que o EtOH era o elixir da vida, um remédio para tratar quase todas as doenças (ANTHONY, 1998; WOUUDA et al. 2010).

Desde o início de seu uso pelas mais variadas sociedades, os efeitos (sedação, anestesia) do EtOH sobre o indivíduo, assim como sua capacidade de modificar e/ou alterar o comportamento era conhecido e, com o desenvolvimento de pesquisas buscou-se compreender os efeitos deletérios aos diversos órgãos e sistemas do organismo. Embora sendo aceito socialmente, sua disponibilidade sofreu restrições a fim de controlar ou prevenir o uso indevido (ROOM, 2006).

Em diversas partes do mundo, ingerir bebidas alcoólicas é uma característica comum de encontros sociais. No entanto, este hábito acarreta riscos e consequências severas à saúde que estão diretamente relacionadas ao seu consumo agudo ou crônico. A sensação inebriante após sua ingestão mascara o perigo, contribuindo para provável dependência (CARLINI, 1993; 1994). Somando-se a isto, o uso abusivo de EtOH pode promover anormalidades estruturais e funcionais do sistema nervoso central (SNC), deficiência nutricional, além de implicações sócio-econômicas para maioria das nações (HARPER, 2007; 2009).

Considerado como uma substância tóxica que pode gerar danos em diversos órgãos, o EtOH representa a terceira principal causa de problemas de saúde na Europa, estando relacionado com o aumento da mortalidade nos últimos 30 anos, e as internações hospitalares, na Inglaterra relacionada ao seu uso, representam mais de 1 milhão por ano. (OFOREI-ADJEI et al. 2007; REHM et al. 2009; NORTH WEST PUBLIC HEALTH OBSERVATORY, 2011).

Segundo relatório da Organização Mundial da Saúde (OMS) (2011), o consumo varia amplamente em todo o mundo, mas as consequências tais como, doença e óbito permanecem significativos na maioria dos países. Quase 4% de

todas as mortes no mundo são atribuídas ao EtOH, maior do que as mortes causadas pela Síndrome da Imunodeficiência Humana Adquirida (AIDS), a violência ou a tuberculose. O uso desta droga também é associado com questões sociais graves, incluindo a violência, negligência e abuso infantil além de ser responsável por grande parte do absentismo no local de trabalho (OMS, 2011). O relatório ressalta que seu consumo apresentou perspectivas abrangentes em nível global, nacional e regional, necessitando por partes das Nações estratégias que possam conter ou minimizar tais expectativas.

Nas Nações em desenvolvimento, o EtOH é classificado como a quarta causa de incapacidade entre os homens e sua ingestão é particularmente problemático na América Latina e Caribe (LAC), conforme Relatório do Banco Mundial (2002).

Na América Latina, aproximadamente 16% dos anos de vida útil são perdidos pelo uso do esta substância psicoativa, tornando-se algo extremamente preocupante, uma vez que este índice é quatro vezes maior que a média mundial, o que torna o problema da prevenção e tratamento dos transtornos atrelados a seu consumo um grande desafio para saúde pública dos países (OMS, 2011).

Segundo o Ministério da Saúde do Brasil(2006), a grandeza desta situação estigmatiza e promove a exclusão social e no país existe em torno de 6 bilhões de pessoas nesta situação. O uso do EtOH impõe às sociedades de todos os países uma carga global de agravos que, além de indesejáveis, são extremamente dispendiosos, acometendo os indivíduos em todos os domínios de sua vida. A reafirmação histórica do papel nocivo que esta droga oferece, deu origem a um leque extenso de respostas políticas para o enfrentamento dos problemas decorrentes de seu consumo excessivo, confirmando assim a magnitude no contexto de saúde pública mundial (MS DO BRASIL, 2006).

O EtOH, mesmo sendo estruturalmente distinto de outros agentes, tais como: inalantes e benzodiazepínicos, deprime o funcionamento do SNC. Este difere da maioria dos outros depressores pelo fato de estar amplamente disponível e acessível, além de seu uso legal e aceito pela maioria das sociedades. Os efeitos do seu consumo no SNC são comprovados e perturba o delicado equilíbrio entre as funções excitatórias e inibitórias do encéfalo (CARLINI, 1994).

As internações de mulheres por transtornos mentais e comportamentais inerentes ao consumo de EtOH representam 2%, enquanto que os homens apresentaram 20%. A ingestão desta substância está sendo precocemente iniciado

por homens e mulheres indicando que as ações de prevenção e promoção para jovens e adolescentes também merecem investimento e monitoramento (MS DO BRASIL, 2006).

Ainda neste contexto, segundo dados do Centro Brasileiro de Informação sobre Drogas Psicotrópicas (CEBRID) (2005), o consumo do EtOH tem sido iniciado em uma faixa etária cada vez menor, estando este disponível facilmente na fase da adolescência, que corresponde a um público alvo, acarretando graves problemas para saúde com impactos duradouros que podem prevalecer por toda a vida.

Estudos recentes demonstraram que o EtOH afeta diferentemente o funcionamento do cérebro na adolescência e na fase adulta e que doses agudas modificam de maneira mais severa o processo de aprendizagem em jovens adolescente do que em indivíduos adultos (ACHESON et al. 1998; MARKWIESE et al. 1998; CREWS, 2000, REBEKAH, 2012).

## **1.2 EtOH e Sistema Nervoso Central**

Substâncias psicoativas têm a capacidade de interferir em sistemas existentes no organismo que são responsáveis pelas sensações prazerosas, desagradáveis e nas respostas emocionais por meio da comunicação sináptica entre os neurônios e na interação com neurotransmissores específicos. Se por um lado tais substâncias oferecem alívio para uma série de problemas médicos, incluindo diversos transtornos psiquiátricos, por outro lado seu consumo abusivo é considerado um dos maiores problemas da atualidade (WHO, 2011).

Desde a pré-história, as substâncias psicoativas acompanham a humanidade, mas atualmente o uso de substância com ação no SNC se tornou um fenômeno generalizado em muitas sociedades, embora existam diferenças culturais que influenciam o tipo e a forma de consumo (MÜLLER; SCHUMANN, 2011; KUNTSCHE et al. 2006; HEATH, 2000).

Como integrante deste grupo, o EtOH interfere no funcionamento do SNC e influencia o comportamento daqueles que o consomem. Apesar de ser uma droga de estrutura química simples e de baixa toxicidade, se comparada com outra substância de abuso (i.e. inalantes), este sem dúvida produz efeitos lesivos sobre o

SNC. Porém, para produzir toxicidade, são necessárias gramas da droga, enquanto que outras substâncias o fazem com doses mínimas (miligramas) (FADA e ROSETTI, 1998). Seus efeitos são considerados dose dependente, visto que em baixas doses afeta a transmissão monoaminérgica e produz desinibição e euforia, enquanto que em doses elevadas exerce efeitos ansiolíticos e sedativos, por aumento da atividade do ácido gama-aminobutírico (GABA) e inibição de aminoácidos excitatórios (SINFORIANI et al. 2011).

Devido suas características químicas e farmacocinéticas, como seu baixo peso molecular, polaridade e o fato de ser hidrossolúvel, o EtOH é difundido pela bicamada lipídica. Esta característica permite que este seja carregado de forma semelhante à molécula de água e atinja alguns setores específicos da célula, incluindo os principais receptores relacionados às funções inibitórias e excitatórias do SNC. Este fenômeno está relacionado com o possível mecanismo de ação deste agente, o qual promove a diminuição da contribuição do processo excitatório e potencializa a atividade neuronal inibitória, que envolve os neurotransmissores: ácido gama-aminobutírico A ( $GABA_A$ ), N-metil-D-Aspartato (NMDA) e outros como Glicina, Nicotínicos neuronais e Serotoninérgicos (5-HT<sub>3</sub>); alterando conseqüentemente seus ligantes (DAVIS, 2003; MAIA et al. 2009).

O SNC possui canais iônicos sensíveis ao EtOH, incluindo os metabotrópicos acoplados à proteína G e regulados pelo ligante e os canais iônicos dependentes de voltagem. Os principais mediadores da neurotransmissão inibitória do cérebro são os  $GABA_A$ , cuja função é estimulada por algumas classes de agentes sedativos. Dados bioquímicos, eletrofisiológicos e comportamentais indicam o receptor  $GABA_A$  como alvo importante para ação *in vivo* desse agente que interfere nas correntes iônicas responsáveis pela homeostase de íons importantes, como cálcio ( $Ca^{2+}$ ), aumenta a atividade dos grandes canais de condutância ao potássio ( $K^+$ ) ativados pelo  $Ca^{2+}$  (LOVINGER, 1993).

Por interferir no equilíbrio excitatório e inibitório, um dos mecanismos que envolvem a toxicidade do EtOH no SNC está relacionado a degeneração neuronal excitotóxica resultante da liberação e ligação excessiva de glutamato aos receptores do tipo NMDA, seguido de influxo de  $Ca^{2+}$  para o citoplasma neuronal, desencadeando uma cascata de eventos intracelulares que irão conduzir a degeneração neuronal (LOVINGER, 1993.; PIA JAATINEN e JYRKI RINTALA, 2008).

Vale ressaltar que, embora na exposição aguda a esta droga possa inibir a ação do glutamato e conseqüentemente a interação com os receptores NMDA, na exposição crônica há aumento da atividade deste receptor reforçando a excitotoxicidade mediada pelo glutamato (IORIO, 1992, 1993).

Os receptores GABA<sub>A</sub>, assim como os NMDA, constituem importantes alvos do EtOH no SNC. A desestabilização da via de transmissão GABAérgica juntamente com a glutamatérgica constituem o principal mecanismo de ação, o qual interferindo na modulação da transmissão pré e pós sináptica e os efeitos de sedação, hipnose, confusão mental, desequilíbrio motor são reflexos desta atividade (FEHR et al. 2006; HEILIG, 2011). Além dos receptores de GABA, segundo Davies (2003), há participação de outros receptores da mesma família de canais iônicos transmembrana, que desempenham papel importante na função depressora do EtOH, que inclui receptores nicotínicos de acetilcolina, glicina e 5-HT<sub>3</sub> cuja função relaciona-se com as sinapses rápidas.

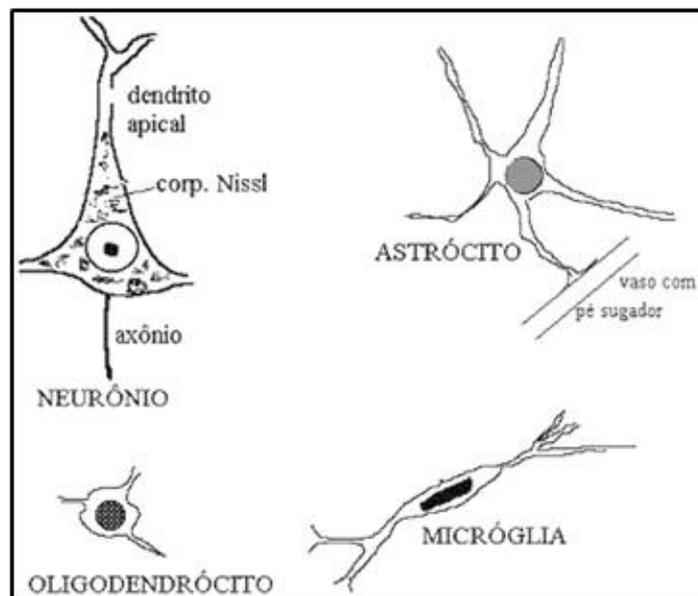
### **1.3 Áreas Neurais Afetadas pelo EtOH**

Diversos estudos demonstraram a interferência do EtOH no conjunto de sistemas humanos, a estrutura cerebral é apontada com área primordial aos efeitos deste toxicante. Sabe-se que o comprometimento do SNC aos efeitos do álcool é difuso afetando o cérebro em toda sua estrutura e comprometendo suas funções, desde as básicas, como motoras, as mais complexas como formação de memória, seus efeitos são percebidos durante e após a exposição (HARPER, 2007; THOMSON et al. 2012). Segundo, Harper (2009) e Sollivan et al. (2003) o corpo caloso e cerebelo são estruturas cerebrais comprometidas pela consumo abusivo desta droga.

Como parte integrante do SNC os grupos celulares constituinte são afetados diretamente pelos efeitos deletérios do EtOH promovendo entre outras funções respostas imunológicas de defesa ao insulto ou alterações afim de reestabelecer propriedades funcionais do organismo ou minimizar o dano causado (HEIKE et al.1997; HE, 2008).

## 1.4 Constituição do Tecido Nervoso

O SNC é constituído por dois importantes grupos de células: as neurais e as células da glia ou glial. A glia, por meio do processo de gliogênese, que é controlada pelo equilíbrio entre a ação ativadora de alguns genes e outros fatores, origina oligodendrócito, astrócito, micróglia e células ependimárias (YOUNG et al. 2008). Os oligodendrócitos são responsáveis pela formação de mielina do SNC. As células da micróglia representam, no SNC, o sistema monocítico macrofágico e têm funções de defesa imunológica; as células ependimárias originam um epitélio que reveste os ventrículos encefálicos e o canal central da medula e os astrócitos compreendem o grupo de células que dentre outras funções, são responsáveis pelo controle de trocas metabólicas entre os neurônios e o sistema vascular (Figura 1) (MORIOKA et al. 1991; NICHOLS et al. 1993; NORENBORG, 1994).



**Figura 1** – Representação da população celular do SNC.

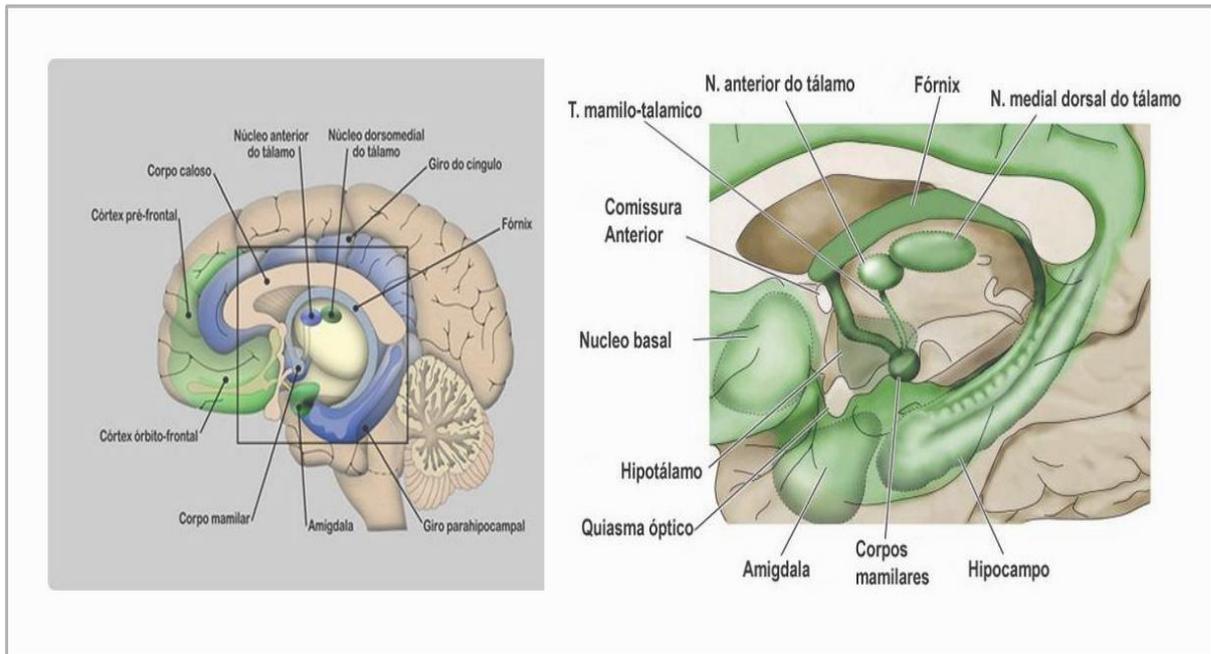
**Fonte:** Adaptado: <http://anatpat.unicamp.br/taneuteecnervnl.html> Imagens.

Os neurônios e seus prolongamentos, por sua vez, estão incluídos em uma massa formada por este grupo de células que irão promover a sustentação do SNC

e quase metade da massa total do cérebro é formada por este grupo, as quais são células altamente ramificadas que preenchem os espaços entre os neurônios. Os astrócitos apresentam relação funcional íntima com os neurônios, proporcionando tanto suporte mecânico quanto metabólico. Embora, tenha um papel subordinado, sabe-se que sem a glia o encéfalo não funcionaria corretamente (RANSON et al. 2003; BUFFO et al. 2010). Todas as regiões que compõe o SNC apresentam todos os tipos celulares da população neural, porém a quantidade e subtipo de cada componente celular depende da região observada.

### **1.5 Sistema Límbico e Hipocampo**

O sistema límbico está localizado em uma região conhecida como ínsula ou lobo límbico e constitui o centro responsável pelo comportamento emocional humano e relaciona-se com a olfação, memória, homeostasia neuroendócrina e autonômica. Dentre as estruturas que o compõe encontram-se as corticais e subcorticais, que incluem a formação hipocampal, córtex olfatório, complexo amigdalóide, hipotálamo, corpos mamilares e giro do cíngulo (Figuras 2) (KANDEL, 2000; ANDERSEN et al. 2003).



**Figura 2** – Arquitetura anatômica do sistema límbico.

**Fonte:** Adaptado: [http://www.inecusp.org/cursos/curso%20VII/estresse\\_compartilha.htm](http://www.inecusp.org/cursos/curso%20VII/estresse_compartilha.htm)

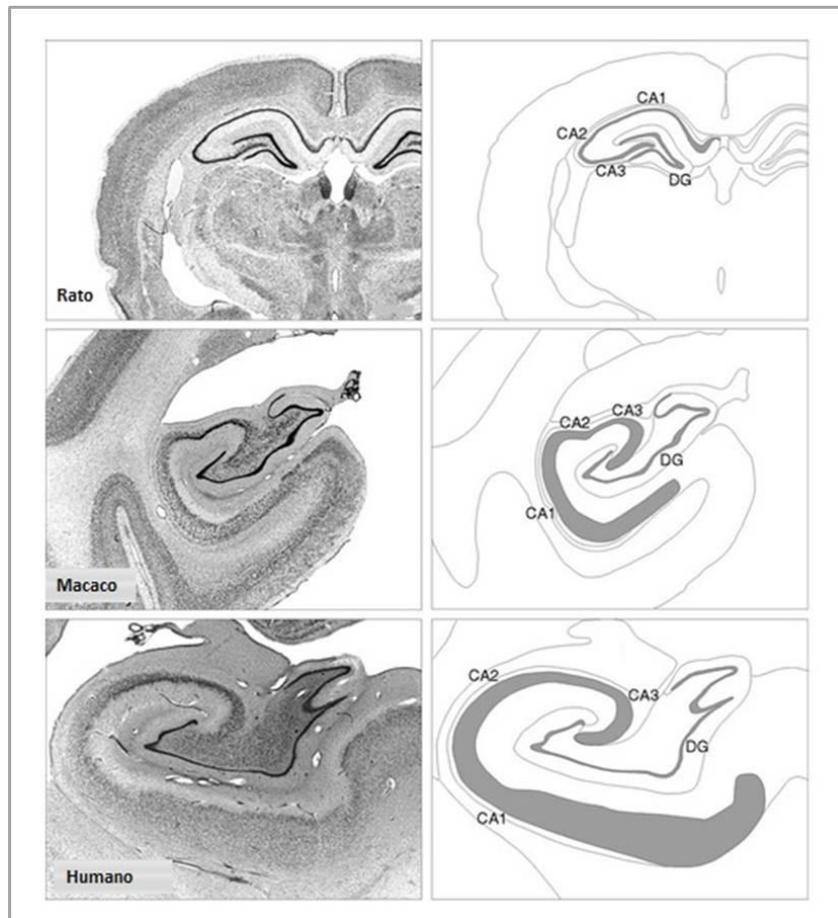
O lobo temporal medial compreende um sistema de estruturas anatomicamente essenciais ao processo da memória, dentre as quais o hipocampo, cujo nome é originado do grego *hippo+kamos* (cavalo + monstro do mar) referência a sua forma que lembra um cavalo marinho (ANDERSEN et al. 2007; SQUIRE et al. 2003) (Figura 3).



**Figura 3** – Estrutura do hipocampo comparada ao cavalo marinho.

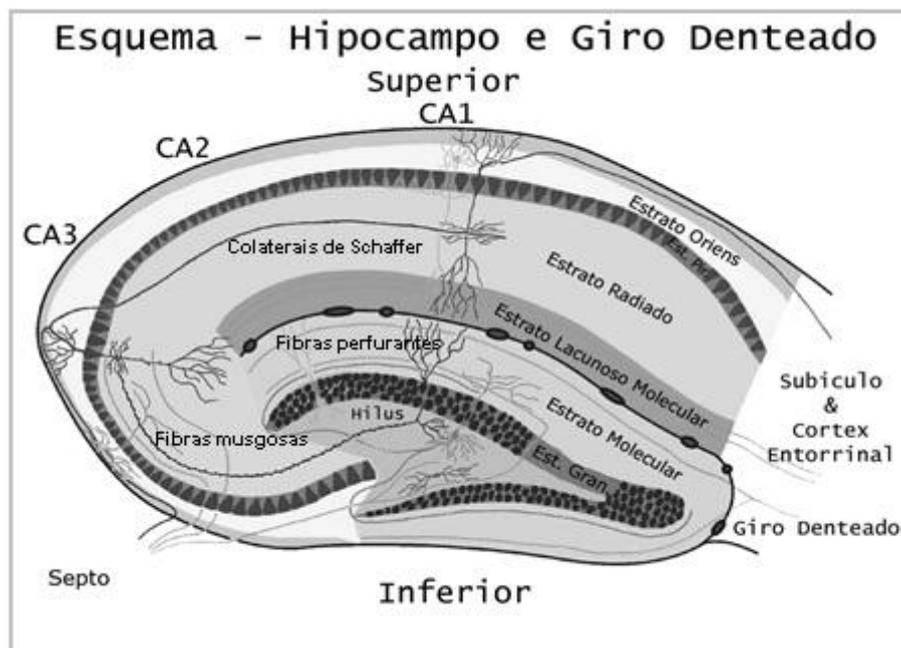
**Fonte:** <http://en.wikipedia.org/wiki/File:Hippocampusandseahorsecropped.JPG>

Sua importância está relacionada por ser uma região fundamental nos processos de aprendizagem e memória, descrita inicialmente por Brenda Milner, em um estudo conhecido como o caso de H.M (SQUIRE et al. 2003). O hipocampo consiste em duas delgadas áreas de neurônio justapostas uma sobre a outra (GAZZANIGA et al. 2006). Estando constituído por duas áreas principais: Corno de Amon, que está anatomicamente dividida em 3 regiões denominadas de CA1, CA2, CA3, sendo que a área CA2 é pequena e praticamente indistinguível em algumas espécies, por isso é geralmente incluído em CA1 nas análises, e o giro denteado do hipocampo (BEAR, 1996; LOMBARDO et al. 2001; REZAYAT et al. 2009) (Figura 4).



**Figura 4** – Representação do hipocampo de rato, macaco e humano.  
**Fonte:** Adaptado Andersen et al. 2007

O hipocampo é constituído por três camadas fundamentais: polimórfica (*stratum oriens*); piramidal (*stratum pyramidale*) e molecular (*stratum radiatum* e *stratum lacunosum-moleculare*). A constituição do giro denteado, por sua vez, compreende a camada polimórfica (*hilus*); camada granular (*stratum granulosum*) e camada molecular (*stratum moleculare*) (SQUIRE, 2003) (Figura 5).

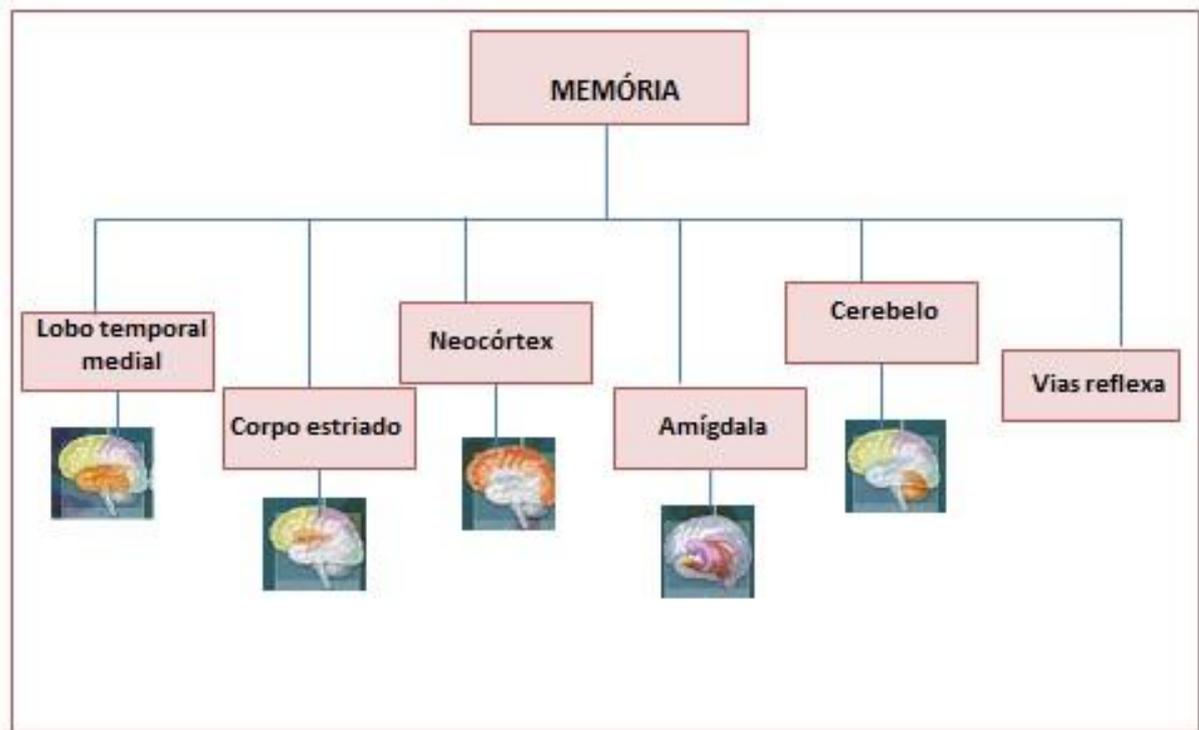


**Figura 5** – Camadas fundamentais do hipocampo.  
**Fonte:** Adaptado: [www.sciencephoto.com](http://www.sciencephoto.com)..

A formação da memória de longa e curta duração está diretamente relacionada com o hipocampo, o qual interage com diferentes áreas corticais aferentes e eferentes regulando a aquisição e o armazenamento de novas informações (IZQUIERDO, 1998). A formação da memória de longa duração envolve uma série de processos metabólicos no hipocampo e em outras estruturas cerebrais compreendendo diferentes fases. Enquanto estes processos não forem finalizados, estes eventos a serem armazenados encontram-se lábeis.

Por conseguinte, o prejuízo da função hipocampal resulta em perturbação dos processos mnemônicos particularmente aqueles associados ao contexto, localização espacial e aspectos da memória declarativa para as quais o hipocampo serve como substrato neural importante. É importante ressaltar que no processo de formação da

memória outras estruturas desempenham papel importante, tais como, lobo temporal medial, corpo estriado, neocórtex, amígdala, cerebelo e vias reflexas. (IZQUIERDO, 2002;2006) (Figura 6).



**Figura 6-** Estruturas envolvidas na memória.  
**Fonte:** Adaptado de Bayley e Squire, 2003.

Portanto, considerando seu papel central no sistema límbico relacionados à aprendizagem, formação e consolidação de memória, perturbações, alterações na estrutura bem como na fisiologia hipocampal, inclusive as promovidas por agentes psicoativos, como EtOH, são importantes para a fisiopatologia de diversas doenças que afetam o equilíbrio deste sistema (BRODAL, 1997; GILMAN. et al.; 2008).

## 1.6 Bioquímica e Plasticidade Neuronal da Memória

As memórias são formadas nos neurônios por meio de complexos códigos que envolvem sinais elétricos e bioquímicos armazenados em redes neurais para

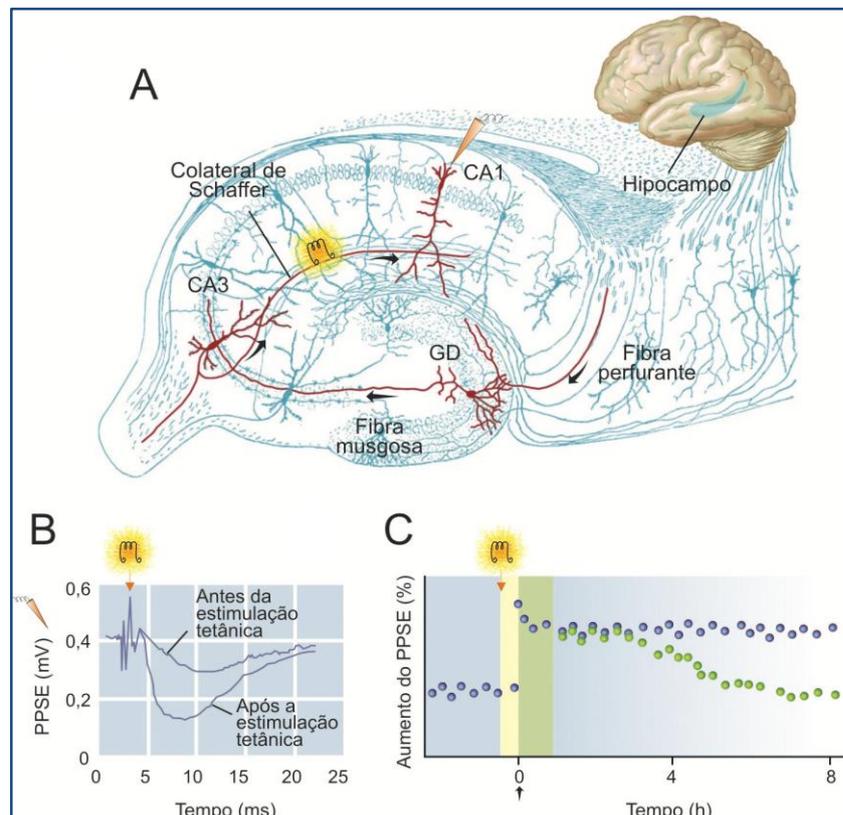
posteriormente serem evocados por estas ou outras redes, que são moduladas pelas emoções, pelo nível de consciência e estados de ânimo (IZQUIERDO, 2006).

Estudos indicam que o processo de geração da memória e aprendizado é diretamente influenciado por alterações na representação neural relacionada a modificações de eventos plásticos que a influenciam. Tais eventos incluem alteração na estrutura, número e distribuição das sinapses, bem como alterações morfológicas, relacionadas ao fenômeno da plasticidade sináptica, que atualmente é considerada base celular e molecular da memória, que por sua vez se relacionam com potencial de longa duração (LTP) e depressão de longa duração (LTD) (BLISS; COLLINGRIDGE, 1993).

O LTP, fenômeno descrito pela primeira vez no hipocampo, assim como a memória, é caracterizado por um curso temporal comum: apresenta uma fase inicial que dura apenas minutos; outra fase precoce de algumas horas e por fim uma tardia de várias horas, semanas e até mesmo anos. Descrita como um aumento na eficiência sináptica dependente de atividade neuronal, a LTP é hoje aceita como modelo de plasticidade sináptica induzido pelo aprendizado e por conseguinte base na formação de memória. Os eventos bioquímicos relacionados com a memória e o LTP envolvem inicialmente a ativação de receptores glutamatérgicos do tipo  $\alpha$ -amino-3-hidroxil-5-metil-4-isoxipropionato (AMPA), seguida pela ativação de receptores glutamatérgicos (NMDA), além de receptores glutamatérgicos metabotrópicos, tendo como sinal inicial de uma LTP o aumento da concentração intracelular de íons  $Ca^{2+}$  que geralmente é desencadeado por uma ação prolongada de glutamato proveniente de uma estimulação rápida intensa e repetitiva (estimulação tetânica) de um terminal pré-sináptico sobre um pós-sináptico. Com a ativação dos três diferentes receptores de glutamato ocorre a ativação de segundos mensageiros paralelos a cascata bioquímica que envolve diversas proteínas entre as quais proteínas quinases, como a quinase-cálcio-calmodulina dependente (IZQUIERDO E MEDINA, 1998, 1999).

O sistema mnemônico envolve fibras do hipocampo, colaterais de Schaffer e aferentes oriundos de regiões externas à região hipocampal – fibras perfurantes – que realizam sinapses com grupo de células granulares desta região (BLISS e COLLINGRIDGE, 1993).

Além dos constituintes descritos, observa-se a participação de células piramidais hipocâmpais que realizam sinapses com os axônios das células granulares e com colaterais de Schaffer, localizadas em uma região específica do hipocampo (*Corno de Amon*). O fenômeno do LTPs envolve primariamente as ações excitatórias do glutamato e seus receptores, além de segundos mensageiros e síntese de ácido ribonucleico. A LTD caracteriza-se também como um tipo de plasticidade sináptica no hipocampo, onde o circuito envolvido é o mesmo do LTP, mas com sinal contrário e ocorre também em regiões como cerebelo e neocórtex (BLISS e COLLINDGE,1993) (Figura 7).



**Figura 7** – Esquema da LTP que ocorre em diversas regiões do SNC, especialmente no hipocampo, representação da circuitaria básica.

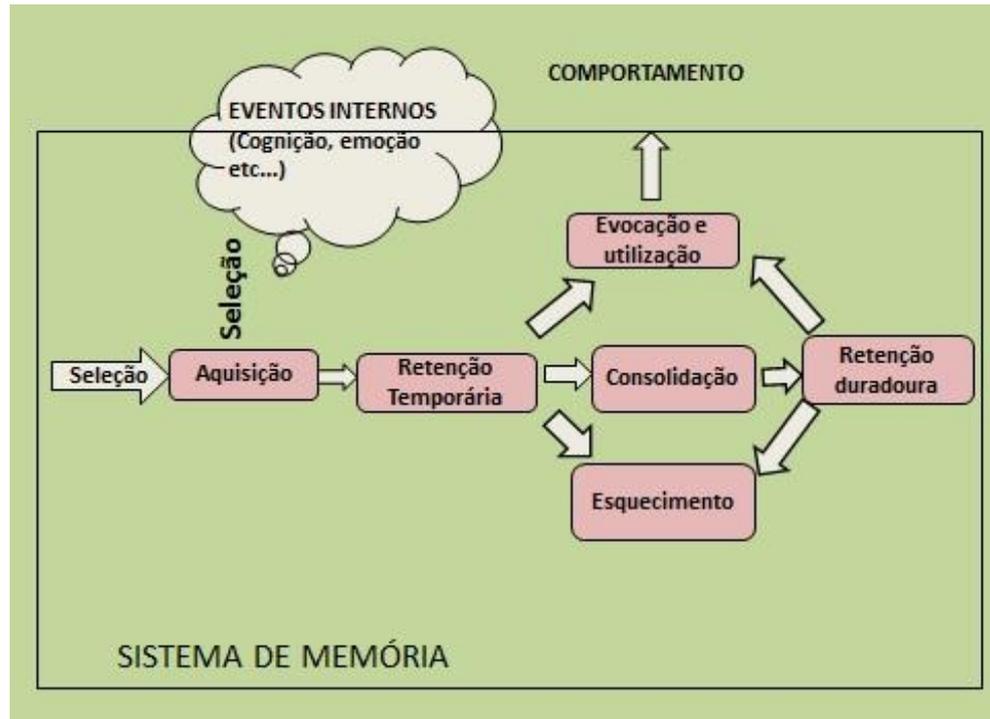
**Fonte:** Adaptado: Lente, 2010.

## 1.7 Aprendizado e Memória

A capacidade de armazenar informações originadas de experiências, bem como evocá-las é, sem dúvida, uma das mais intrigantes funções do cérebro. O aprendizado e a memória são componentes deste processo. Denomina-se de aprendizado, ao processo de aquisição de uma nova informação, que pode ser observada por meio de uma mudança de comportamento, e a codificação, armazenamento e evocação desta informação denomina-se memória (IZQUIERDO, 2006).

O termo memória, refere-se ao processo pelo qual se adquire, forma-se, conserva-se e se evoca informação. Aprendizado é caracterizado pela etapa de aquisição da informação enquanto que a evocação é dita de recuperação e lembrança. Este processo está intimamente ligado a quem e o que somos, já que só lembramos daquilo que de alguma forma gravamos, o que de alguma maneira aprendemos (IZQUIERDO, 1999).

O estudo dos processos da memória vem se beneficiando do conceito de modularidade das funções, isto é, da noção de que a memória compreende um conjunto de habilidades mediadas por diferentes módulos do sistema nervoso, que funcionam de forma independente, porém cooperativa. O processamento das informações nestes módulos se estabelece de forma paralela e distribuída, permitindo que grande número de unidades de processamento influenciem outras unidades em qualquer momento no tempo, e que grande quantidade de informações sejam processadas concomitantemente. A memória pode se distinguir em três fases ou sequências: aprendizagem, que corresponde à recepção e registro da informação; armazenamento (ou consolidação), que computa sua codificação cerebral; e a recordação que caracteriza a evocação e o reconhecimento das informações anteriormente armazenadas (IZQUIERDO, 1999) (Figura 8).



**Figura 8** - Representação esquemática da memória demonstra sequencia de etapas iniciados a partir da entrada de um novo evento proveniente do ambiente externo ou mesmo da mente do indivíduo.

**Fonte:** Adaptado: Lente, 2010.

### 1.8 Tipos de Memória

As memórias são classificadas de acordo com sua duração e natureza. Quanto ao tempo de retenção, classificam-se em: imediata, de curta duração (*short-term memory* - STM) e longa duração (*long-term memory*- LTM). Na primeira, o tempo de retenção não supera mais que alguns segundos, a segunda pode durar minutos ou horas e a LTM pode prevalecer por horas, dias, semanas e anos e é a responsável por estabelecer engramas duradouros (IZQUIERDO, 1999).

Em relação à natureza, a memória é classificada em memória declarativa ou explícita; não declarativa ou implícita e a memória de trabalho (*working memory* - WM). Pode-se denominar de memória declarativa ou explícita aquela que pode ser evocada por meios de palavras ou outros estímulos e está subdividida em: episódica, quando envolve eventos relacionados ao tempo e datas; e semântica quando relacionada a processos, conceitos atemporais. A memória não declarativa ou

implícita é caracterizada por não precisar ser descrita por palavras, além de requerer maior tempo e treinamento para se formar e é subdividida em: memória de trabalho, que é aquela utilizada para armazenar temporariamente informações que são necessárias para raciocínio imediato, resolução de problemas ou mesmo para confecção de um determinado comportamento e pode ser esquecida, descartada rapidamente, memória de procedimento a qual está relacionadas com aquisição de dados mediante repetição as incluem-se habilidades motoras e toda forma de condicionamento (IZQUIERDO, 2006).

O EtOH ao perturbar as funções excitatórias e inibitórias do SNC, interfere nos mecanismo da plasticidade sináptica envolvidos nos eventos do e LDT e LTD modificando assim as bases moleculares do aprendizado e memória, ocasionando danos aos que consomem em diversas funções orgânicas incluindo os processos mnemônicos (BAKER, 2002).

O EtOH interfere nos processos cognitivos, e isto depende do tempo, período e intensidade da exposição. Considerando que o início de consumo de bebidas alcoólicas está cada vez mais precoce, este trabalho buscou avaliar os efeitos deletérios da exposição ao etanol em fases iniciais da vida (adolescência) objetivando ainda, contribuir com estudos que demonstram experimentalmente, em modelos animais, o efeito deste agente no SNC permitindo uma melhor compreensão dos processos lesivos, áreas afetadas e grupos neurais comprometidos devido a exposição crônica a esta substância.

---

---

## **II OBJETIVOS**

---

---

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Investigar os efeitos neurocomportamentais, no processo mnemônico e as alterações na densidade celular no hipocampo em ratos Wistar, após exposição crônica ao EtOH da adolescência a fase adulta.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Investigar as alterações relacionadas à ansiedade após exposição crônica ao EtOH;
- Avaliar as alterações nos processos de aprendizagem e memória;
- Investigar possíveis alterações na densidade celular no hipocampo decorrente da exposição;
- Analisar quantitativamente a alteração na densidade de células no hipocampo.

---

## **III MATERIAL E MÉTODOS**

---

### 3.1 Animais de Experimentação

Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisas com animais de experimentação da Universidade Federal do Pará (UFPA), e parecer BIO-CEPAE-UFPA: BIO 007- 09, em anexo, obedecendo-se aos critérios e as normas estabelecidas por Guias de Cuidado e Uso de Animais Laboratoriais.

Foram utilizados ratos *Wistar*, fêmeas (n= 30), 1 mês de idade, provenientes do Biotério da UFPA. Estes animais foram encaminhados para Faculdade de Farmácia da UFPA, onde foram mantidos em uma sala de manutenção em condições padronizadas de temperatura (25°C), exaustão, ciclo de luz claro/escuro de 12 horas, água e comida *ad libitum*. No ambiente em que foram realizados os ensaios comportamentais, utilizou-se lâmpadas fluorescente para iluminação e com controle de temperatura e nível de ruído.

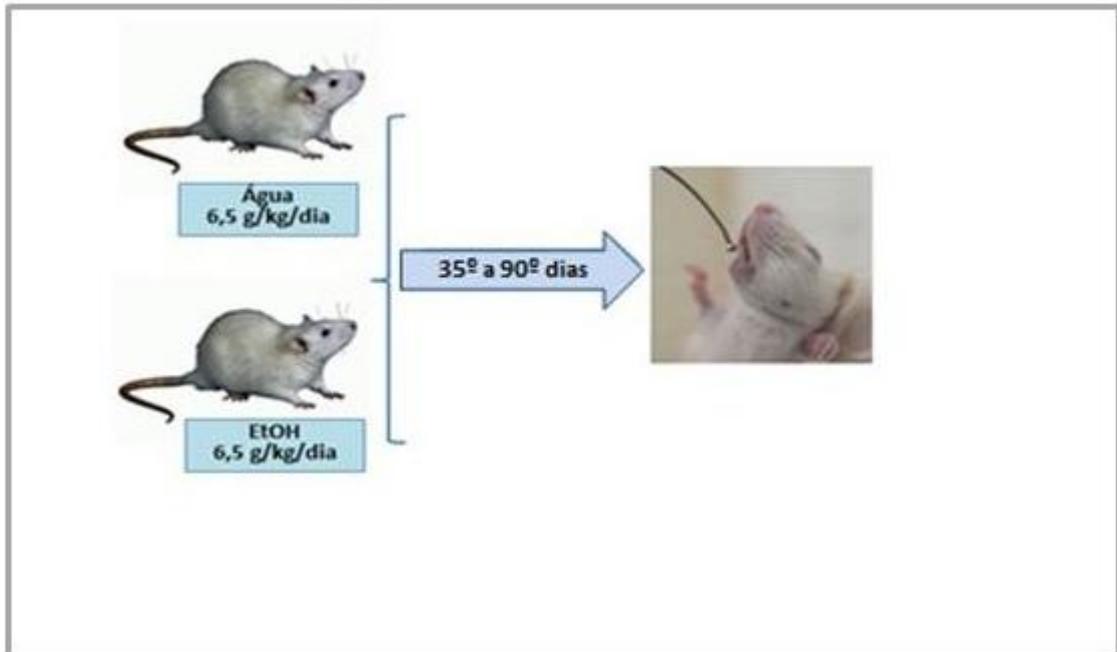
Os ensaios comportamentais foram realizados no Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Comportamento da Faculdade de Farmácia (LAFICO), do Instituto de Ciências da Saúde, e as avaliações histológica foram realizadas no Laboratório de Neuroproteção e Neuroregeneração Experimental (LNNE), do Instituto de Ciências Biológicas, ambos na UFPa.

Para este estudo foram utilizados dois grupos experimentais sendo: grupo controle tratado com água destilada (n = 15) e o grupo exposto ao EtOH (n = 15).

### 3.2 Tratamento com EtOH

Depois de estabelecido os grupos, as ratas foram mantidas em caixas próprias em grupos de 5 animais para evitar o estresse pelo isolamento. Ao completarem 35 dias de idade (adolescência) receberam, por via intragástrica (gavagem) água destilada ou EtOH P.A (Nuclear, Brasil) na dose de 6,5 g/kg/dia

(22,5% p/v) (MAIER e WEST, 2001; MAIA et al. 2009) até completarem 90 dias (fase adulta). As soluções foram administradas em volumes de 1mL/Kg (figura 9).



**Figura 9** – Esquema de tratamento dos grupos experimentais. Os grupos de 15 ratas cada recebeu por gavagem EtOH ou água destilada do 35º de idade(adolescência) ao completar 90º dias (fase adulta).

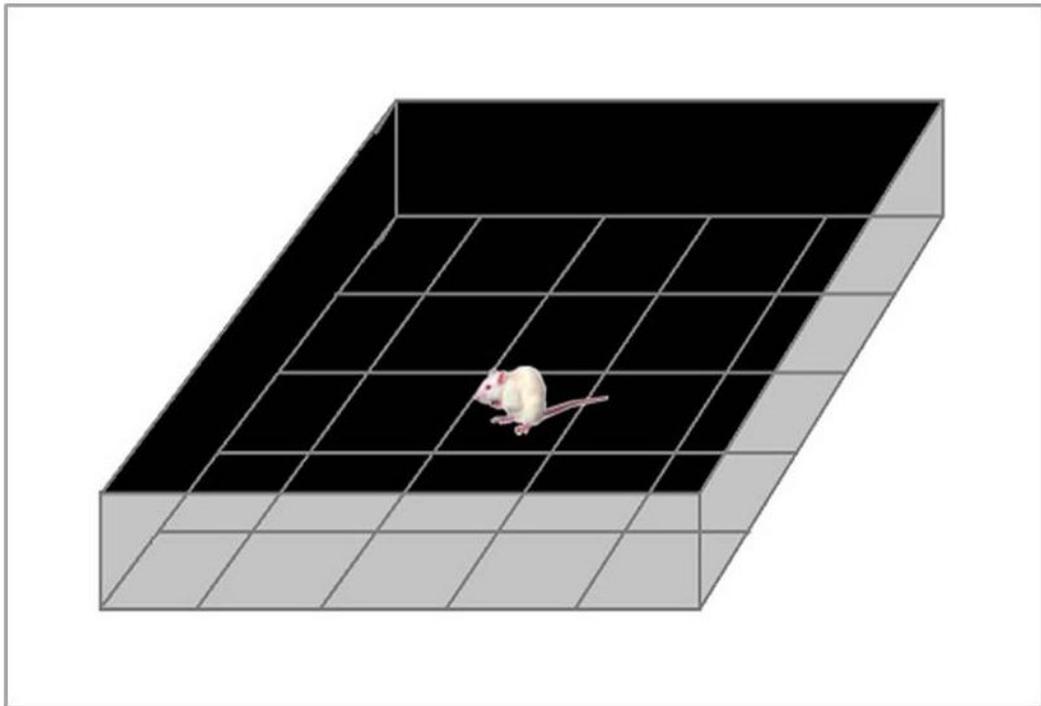
### 3.3 Ensaio Comportamentais

Após 24 horas da última administração de EtOH foram iniciados os testes para avaliação comportamental. Inicialmente os animais foram conduzidos ao LAFICO para aclimação e habituação ao ambiente de teste.

Todos os ensaios para avaliação do comportamento foram realizados em sala própria, com atenuação dos níveis de ruído e baixa intensidade de iluminação (12 lx). Com o objetivo de evitar as variações circadianas que poderiam interferir com os resultados experimentais, todos os ensaios foram conduzidos entre 7:00 e 12:00h.

### 3.3.1 CAMPO ABERTO

Neste estudo, foi utilizada uma arena em madeira com dimensões de 100x100x40cm e base dividida em vinte e cinco quadrantes de iguais dimensões de 20x20 cm (Figura 10).



**Figura 10** – Representação esquemática do campo aberto.

O objetivo deste teste é avaliar atividade exploratória e locomotora de animais, bem como o estado de emocionalidade/ansiedade, por meio da mensuração das variáveis comportamentais dos indivíduos experimentais. Neste estudo, as variáveis mensuradas incluem a locomoção total; percentual de tempo na área central; número de quadrantes centrais e frequência no comportamento de levantamento

(*rearing*) (PANDOLFO et al. 2007), que são empregados para avaliar o comportamento do animal mediante uma situação de novidade, assim como a habituação e aprendizagem em resposta ao ambiente experimental (AGUIAR, 1995).

O ensaio consistiu em colocar cada animal no quadrante central da arena e registrar o número de quadrantes cruzados pelo animal no período de 5 min. Entre os testes de cada animal, o aparato foi limpo com álcool a 10%, a fim de evitar alteração no resultado dos animais seguintes. Foi considerado mudança de quadrante quando o animal ultrapassava com as 4 patas para o interior do quadrante adjacente.

Ao término da aplicação do teste do campo aberto, os animais foram conduzidos ao teste do reconhecimento social.

### 3.3.2 RECONHECIMENTO SOCIAL

Neste ensaio foi utilizada uma caixa em acrílico de acomodação de ratos com dimensões 30x20x12 cm.

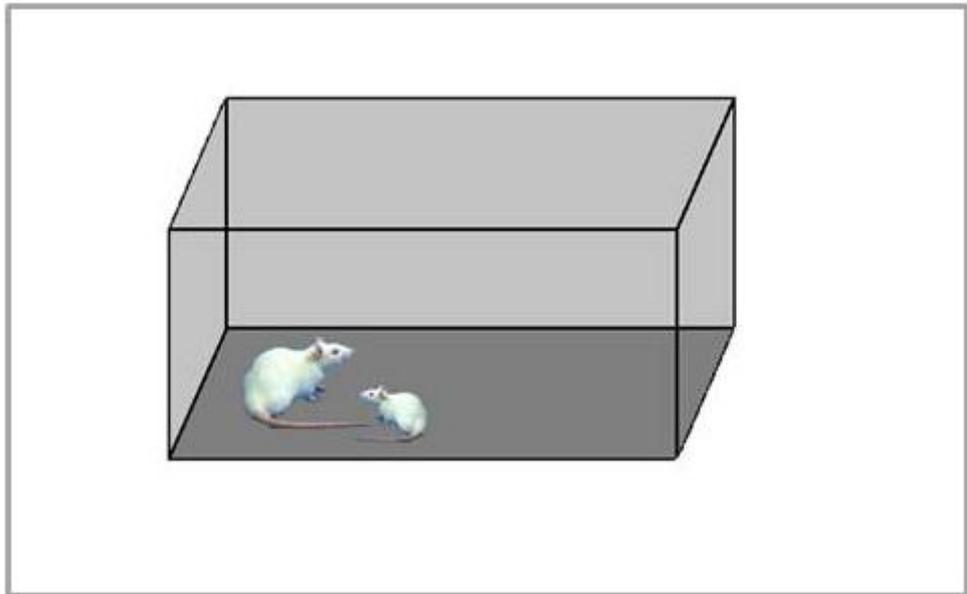
Para este teste foram utilizados, os animais experimentais adultos e duas ratas juvenis com 25-30 dias de idade. Os animais jovens, neste experimento, serviram apenas como estímulo social para os animais adultos. Na realização do ensaio, os animais adultos foram mantidos em caixas de acomodamento separados dos juvenis.

Descrito por Dantzer et al. (1987), o teste é empregado para avaliar a memória social em curto período. Consiste em duas exposições sucessivas de 5 min cada, separadas por um intervalo de 30min. Foi considerado parâmetro para análise, a intenção de aproximação do rato adulto com o juvenil. Considerou-se como intenção de relacionamento social o ato de cheirar, lamber ou quaisquer tentativas de aproximação do animal experimental com animal juvenil e foram cronometradas, em ambas as exposições, o tempo em que o rato adulto emprega na investigação do animal jovem (PREDIGER et al. 2004).

O procedimento consistiu em colocar o rato adulto na caixa-teste por 3 min, sendo retirado em seguida. Após este procedimento o animal adulto foi recolocado na caixa e foi introduzido o animal juvenil por 5 min. Neste período, foi cronometrado

o tempo que o animal adulto empregou para investigar/explorar o animal jovem e, após este procedimento o jovem retornou para sua caixa aguardando a segunda exposição.

Após 30 min da primeira exposição, os animais adultos e juvenis foram reintroduzidos na caixa-teste por mais 5 minutos, onde foram adotados todos os procedimentos anteriormente citados (Figura 11).



**Figura 11** – Representação esquemática do teste de reconhecimento social.

Após a realização do teste de reconhecimento social, os animais foram submetidos ao teste de esQUIVA INIBITÓRIA.

### 3.3.3 ESQUIVA INIBITÓRIA

A esQUIVA passiva do tipo *Step Down* (INSIGHT<sup>®</sup>, EP 104R), é um equipamento confeccionado em alumínio de 2 mm, com pintura epóxi de alto impacto, na cor bege claro, chão em barra de aço inoxidável com espaçamento de 12,5 mm, área interna de fuga com dimensões com 200 mm x 75 mm, porta e frente em acrílico transparente, bandeja coletora de dejetos e urina ( Figura 12).



**Figura 12** – Esquiva Passiva do tipo *step-down*.  
**Fonte:** [www.insightltda.com.br](http://www.insightltda.com.br)

Utilizado nos estudos sobre aprendizagem e memória, o teste consiste na obtenção da resposta comportamental a partir de um estímulo aversivo (IZQUIERDO, 1998; MAIA et al. 2009).

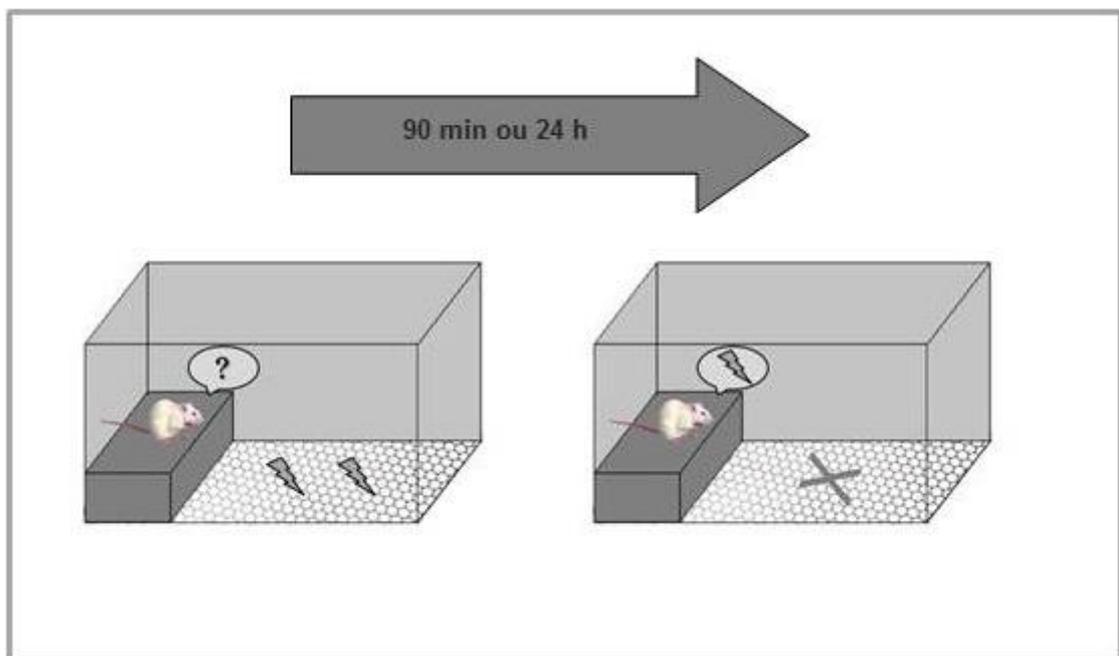
A esquiva inibitória de uma sessão é um modelo de condicionamento ao medo que envolve estímulo condicionado (EC) e não condicionado (ENC), a parte segura da esquiva (plataforma) representa o EC e o choque aplicado na pata do animal ao descer da plataforma com as quatro patas o ENC. Neste ensaio, a expressão da memória é avaliada na ausência do estímulo não condicionado, estando definido como latência o tempo de descida da área segura (CAMMAROTA et al. 2004).

O protocolo experimental foi aplicado em um período de três dias que consistiram, no 1º dia com a habituação dos animais ao aparato por um período de 180 s. No segundo dia, os animais foram adequadamente colocados na plataforma com a face virada de forma oposta ao observador. No momento em que o animal desceu com as quatro patas na grade, este recebeu um choque de 0,4  $\mu$ A por 1 s e foi retirado imediatamente do equipamento. Esta etapa corresponde ao procedimento de linha de base (LB1) e o tempo em que o animal desceu da plataforma foi cronometrado.

A MCD, considerada neste ensaio linha de base dois (LB2) foi avaliada 1,5h após o procedimento da LB1. O tempo de permanência do animal na plataforma até que o

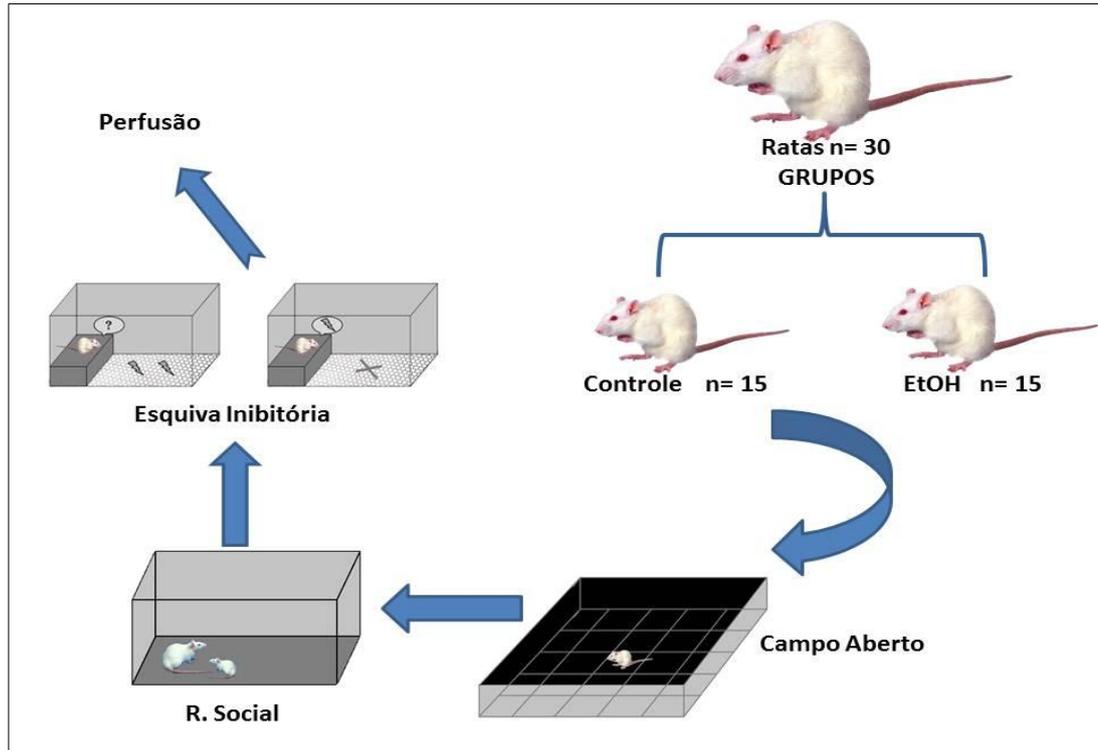
mesmo desça com as quatro patas foi considerado indicativo de retenção de memória. Foi padronizado como tempo máximo de espera (latência) para descida do animal neste ensaio, o intervalo de 180 s.

Após 24 h da LB2 (terceiro dia), os animais foram recolocados no aparato como descrito anteriormente para avaliação da MLD. O tempo de permanência do animal na plataforma até que o mesmo desça com as quatro patas foi considerado indicativo de retenção de memória. (Figura 13).



**Figura 13** – Esquema do teste para avaliação de memória.  
**Fonte:** Adaptado de Mello, 2008

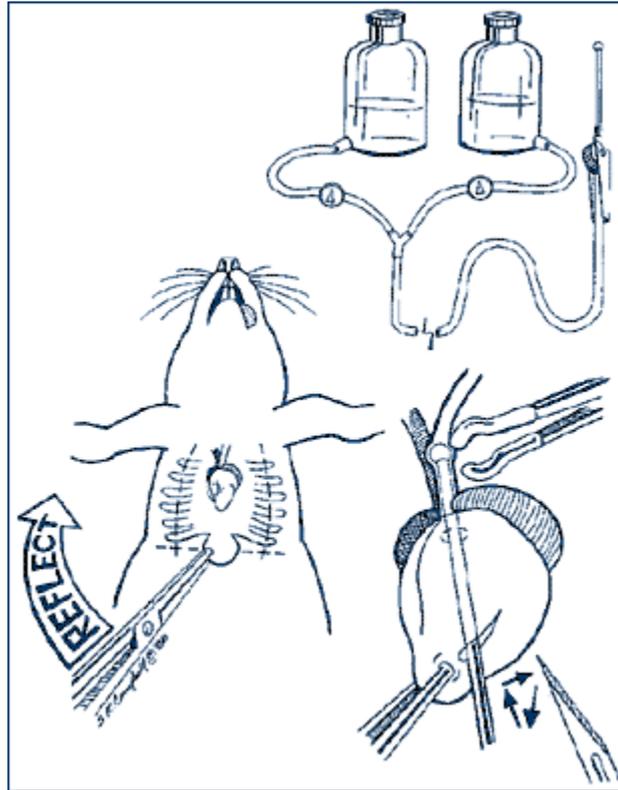
Após os testes comportamentais, os animais foram encaminhados para perfusão. Todos os procedimentos experimentais estão ilustrados na figura 14.



**Figura 14**– Esquema de procedimentos adotados nesta investigação.

### 3.4 Perfusão e Processamento Tecidual

Ao término dos ensaios comportamentais, os animais foram anestesiados com uma mistura de cloridrato de cetamina (Vetanarcol®, König 72mg/kg), cloridrato de xilazina (Kensol®, König 9mg/kg). Ao cessar os reflexos de retirada da pata e corneanos, os animais foram perfundidos através do ventrículo esquerdo do coração com solução salina a 0,9% heparinizada (250- 300 mL), seguida de igual volume da solução de paraformaldeído a 4% (GOMES-LEAL, 2004; GUIMARÃES, 2011) (Figura 15).

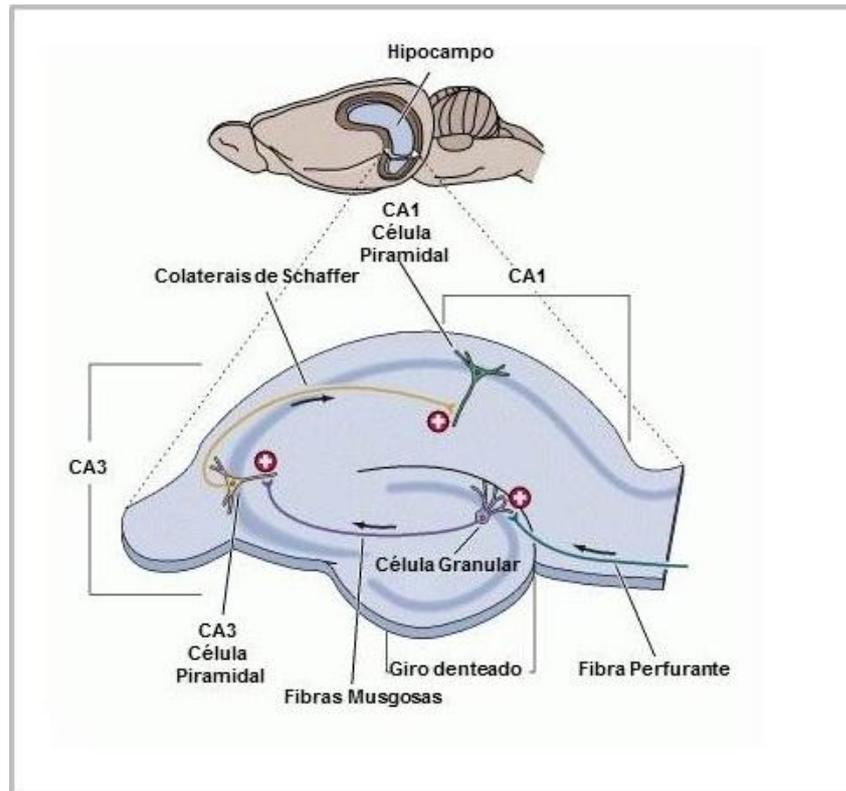


**Figura 15** – Procedimento de perfusão. Após anestesia cada animal foi perfundido através do ventrículo esquerdo do coração com solução salina 0,9% heparinizada, seguida de fixação aldeídica, para posterior craniotomia.

**Fonte:** <http://www.neuroscienceassociates.com/imagem/graphics/perfusions.gif>

Após a perfusão, os cérebros foram removidos da caixa craniana, pós-fixados por 24h no mesmo fixador usado na perfusão (paraformaldeído a 4%). Ao final do período de fixação, visando à proteção tecidual, os cérebros foram imersos em soluções crioprotetoras com concentrações crescentes de sacarose diluídas em uma mistura de glicerina e tampão fosfato 0,05M; pH 7,2 -7,4. (GOMES-LEAL, 2004).

Após a etapa de crioproteção, para obterem-se secções do tecido encefálico, os mesmos foram incluídos em gel de imersão (Tissue-Tek,® Sakura) e congelados em câmara fria - criostato (Carl Zeiss, Mícron HM505E, Alemanha), com efeito Peltier caracterizado pela diminuição abrupta de temperatura (-55 °C) e com auxílio do referido equipamento obteve-se secções coronais de 50 µm de espessura do hipocampo. As secções do hipocampo foram obtidas estabelecendo-se como referencial a horizontalização desta estrutura, cessando-se os cortes quando o mesmo adquirisse a curvatura lateral em direção ventral (Figura 16).



**Figura 16** - Representação esquemática do hipocampo. Atentar para as regiões CA1 e CA3, áreas analisadas nesta investigação.

**Fonte:** <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=neurosci&part=A1710>.

Todas as secções foram montadas diretamente em lâminas gelatinizadas durante a criomicrotomia. Para aumento da aderência das secções, as lâminas foram mantidas à temperatura ambiente por, no mínimo, 24 h antes de qualquer outro procedimento histológico. Após este período, as mesmas foram conservadas à temperatura de -20 °C aguardando procedimento histológico (GOMES-LEAL, 2004).

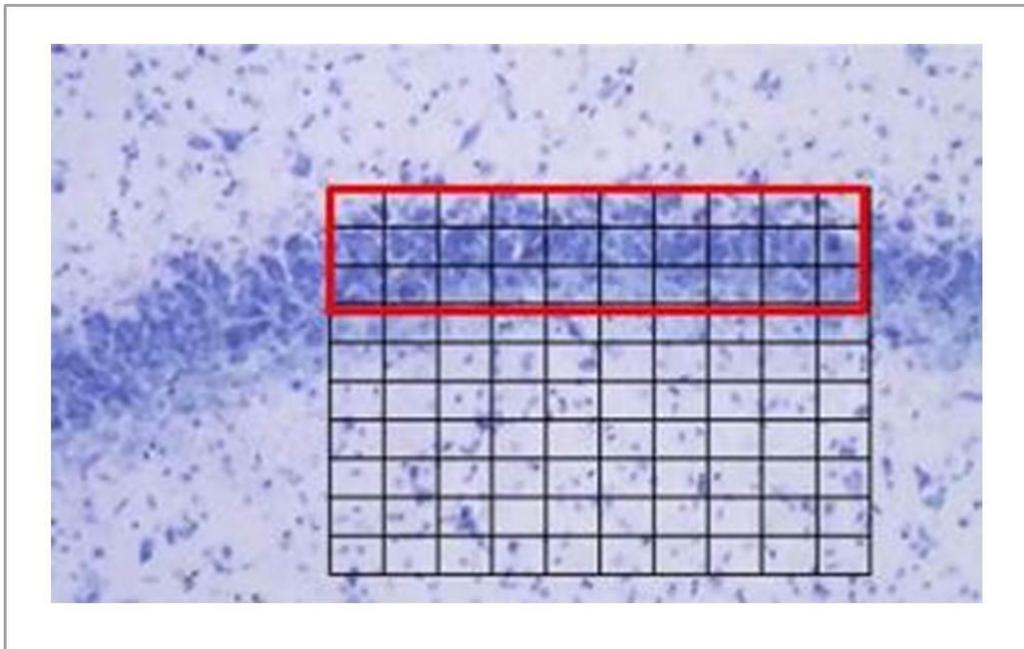
### 3.5 Análise Histológica

As secções de 50 µm foram submetidas ao tratamento histológico de violeta de cresila. Método pelo qual permite a visualização de corpos celulares e possíveis alterações, perda, em casos de injúria ao tecido ou em condições patológicas (GUIMARÃES, 2010).

### 3.5.1 ANÁLISE QUANTITATIVA

Foram contados o número de corpos celulares nos dois grupos experimentais utilizando objetiva de 40X e gradícula de contagem de área 0,0625 mm<sup>2</sup> acoplada à ocular de um microscópio óptico (Eclipse E200, NIKON®). Utilizou-se nas contagens 3 secções por animal, 3 campos por secção, e, pelo menos, 3 animais para cada grupo experimental. Nesta etapa, foi utilizado n= 9 de animais para ambos os grupos.

As regiões contadas compreendem a camada de células granulares de CA1 e CA3 do hipocampo. A gradícula com área total igual a 0,0625 mm<sup>2</sup> dividida em 100 campos iguais foi posicionada sobre a região que se pretendia contar e devido às dimensões reduzidas de CA1 e CA3, contou-se apenas 30 divisões, três campos de 0,01875 mm<sup>2</sup>, que corresponde a trinta, das cem divisões da gradícula. As demais regiões da gradícula de contagem não foram consideradas (Figura 17).



**Figura 17**– Esquema de contagem de corpos celulares em CA1 e CA3 do hipocampo.

### 3.6 Análise Estatística

Ao final dos testes comportamentais, os dados obtidos de cada grupo experimental foram analisados aplicando-se o teste *t de Student* e expressos como a média  $\pm$  erro padrão da média (e.p.m.) com  $n=15$  ratas para os testes comportamentais e  $n=7$  para análise histológica. A probabilidade aceita como indicativa da existência de diferenças significantes foi de  $p<0,05$ . A construção gráfica e a análise estatística foram realizadas no programa GraphPad Prism 5.0.

---

---

## **IV RESULTADOS**

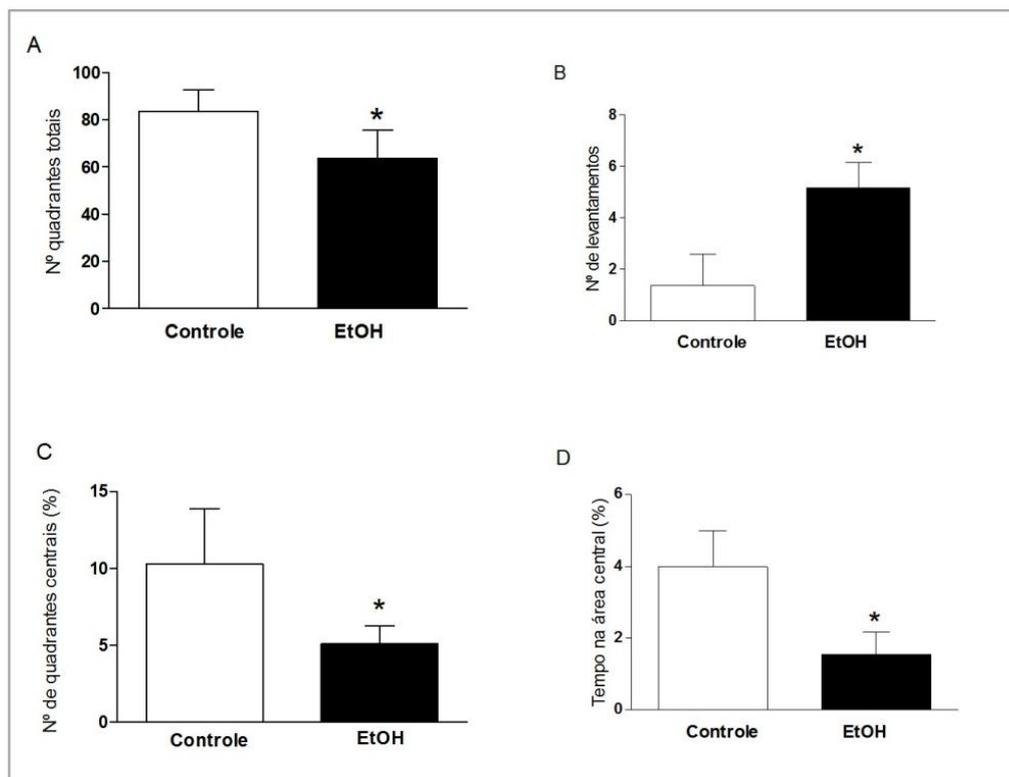
---

---

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Campo Aberto

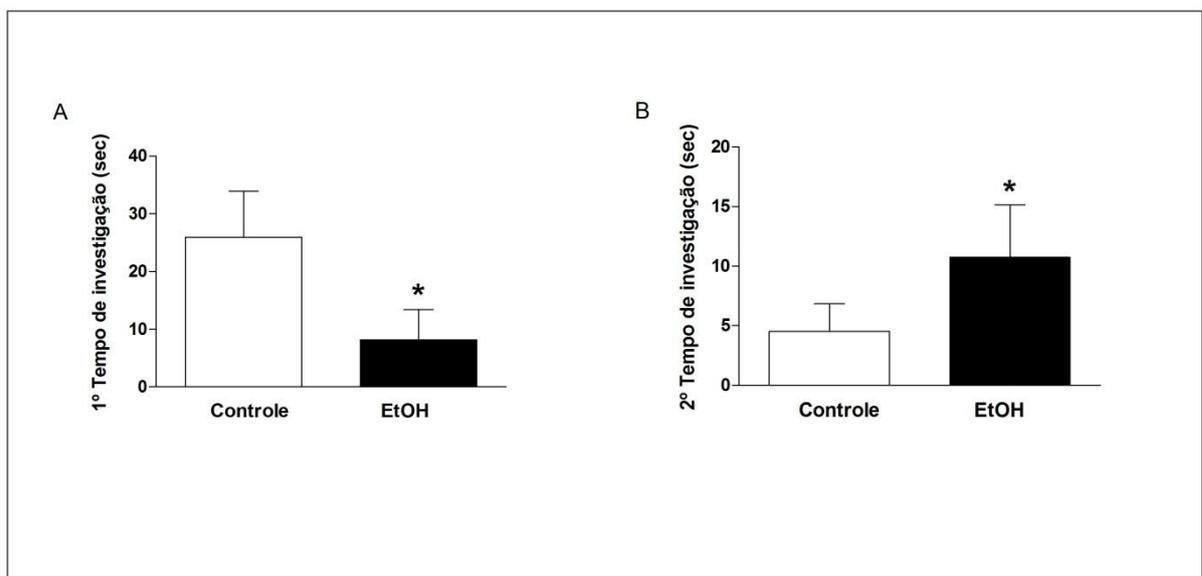
No teste do campo (figura 18), os animais expostos cronicamente ao EtOH apresentaram redução: na locomoção total (painel A) [ $p < 0,0001$ ]; no percentual do número de quadrantes centrais (painel C) [ $p < 0,0001$ ]; e no tempo de permanência na área central (painel D) [ $p < 0,0001$ ] quando comparados ao grupo controle. A análise estatística mostrou que a frequência do comportamento de levantar-se foi maior no grupo exposto ao EtOH do que no grupo controle (painel B) [ $p < 0,0001$ ].



**Figura 18** – Efeito da exposição crônica ao EtOH no teste do Campo Aberto. Nº de quadrantes totais (A); nº de levantamentos em B; atividade locomotora central (%) em C e tempo de locomoção central (%) resultados expressos em média e o erro padrão da média (EPM) de cada grupo. \*Diferença significativa em relação ao controle; Teste *t* de *Student*, significante quando  $p < 0,05$ .

## 4.2 Reconhecimento Social

Os resultados demonstraram que a exposição crônica ao EtOH promoveu alteração na memória de reconhecimento social (painel A) [ $p < 0.0001$ ] e diminuição no tempo empregado na investigação social do rato adulto quando este é reexposto após 30 min da 1ª apresentação ao mesmo animal juvenil (painel B) [ $p < 0.0001$ ], mostrando que a exposição crônica ao EtOH promoveu déficit na memória de reconhecimento social (Figura 19).

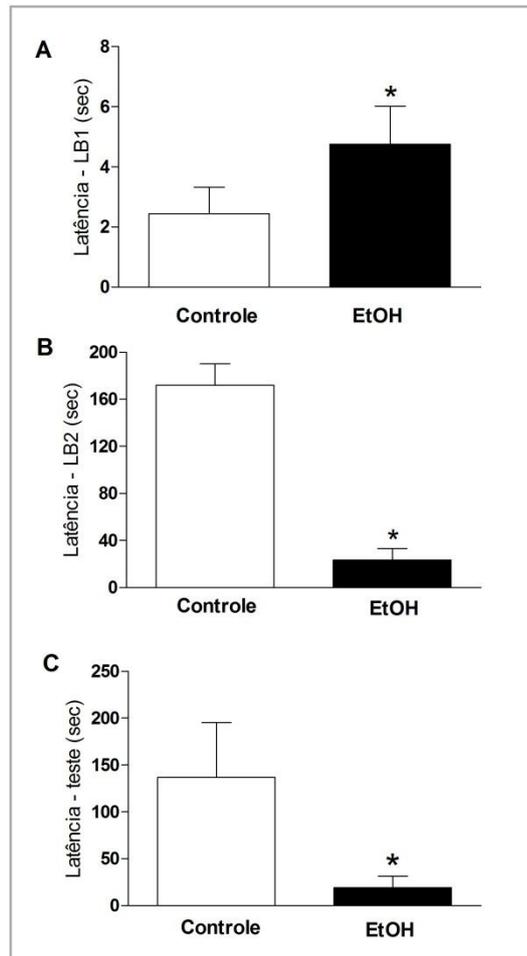


**Figura 19** – Efeito da exposição crônica ao EtOH sobre a memória social de ratos quando o animal adulto é reexposto após 30 minutos da 1ª exposição ao mesmo rato juvenil. Resultados expressos em média e o erro padrão da média (EPM) de cada grupo. \*Diferença significativa em relação ao controle; Teste *t* de *Student*, significativo quando  $p < 0,05$ .

## 4.3 Esquiva Inibitória

Os resultados da exposição crônica ao EtOH (painel A-C) revelou-se significativa ( $p < 0.0001$ ) na latência para avaliação da MCD (1,5h após LB1) e MLD (24h após LB2). Mediante a um estímulo aversivo (choque), houve diminuição do tempo de descida da plataforma do grupo EtOH, quando comparado com o controle

inferindo que a exposição crônica com EtOH gera comprometimento na retenção de memória.

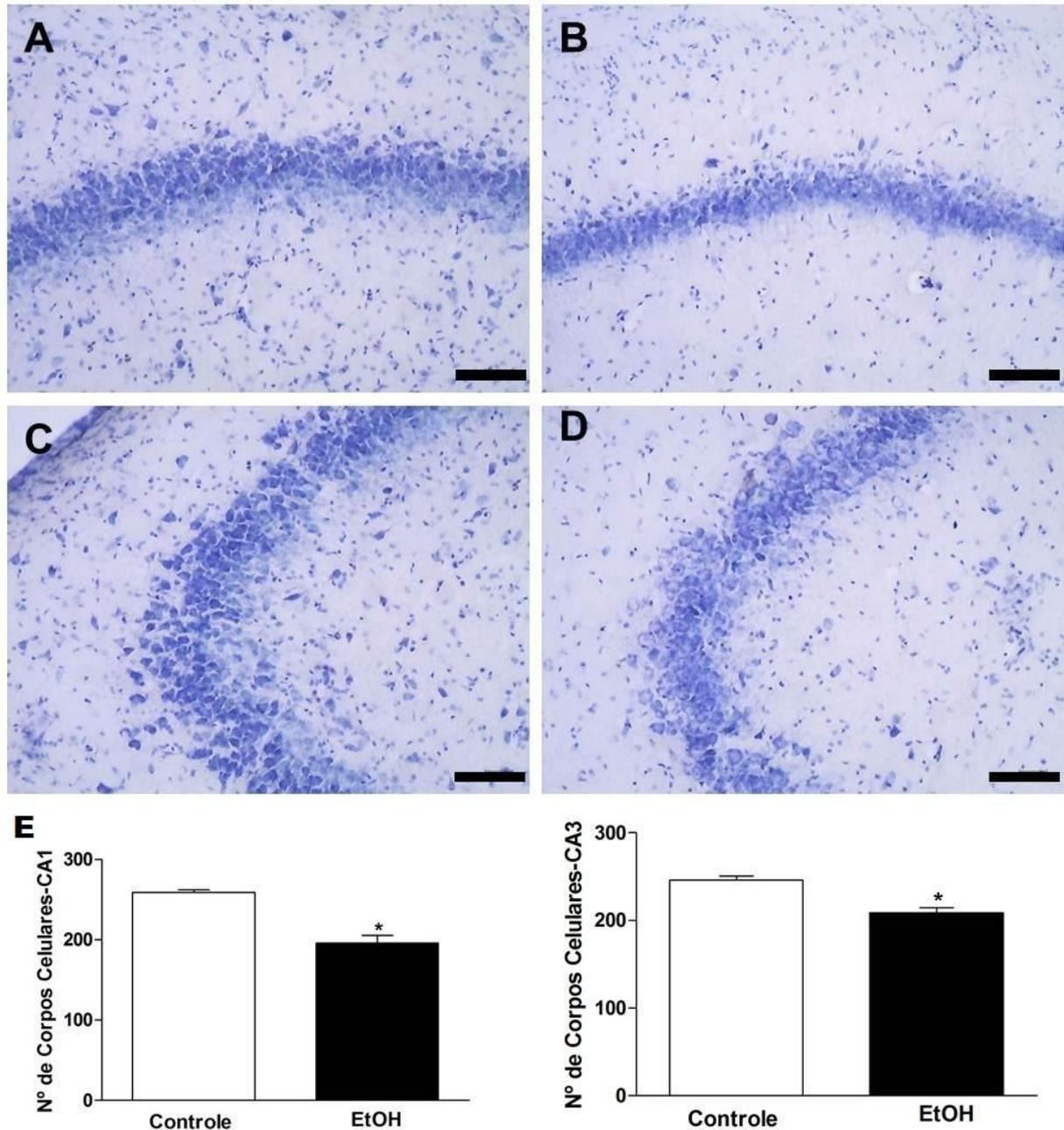


**Figura 20** – Efeito da exposição crônica ao EtOH sobre a MCD e MLD no modelo de esquiava inibitória do tipo *step down*. (A) LB1 tempo que o animal desce da plataforma anterior ao estímulo aversivo. (B) LB2 latência 1,5h após LB1 e (C) tempo de descida 24h posterior ao procedimento LB2. Resultados expressos em média e o erro padrão da média (EPM) de cada grupo. \*Diferença significativa em relação ao controle; Teste *t* de *Student*, significante quando  $p < 0,05$ .

#### 4.4 Alterações na Densidade Celular

Nas secções coradas com violeta de cresila o resultado evidenciou alteração na densidade celular quando se comparou os animais do grupo controle com os animais expostos ao EtOH. Foi observado diminuição do número de corpos

celulares nas regiões CA1 (figura 21,painel B e E) [ $p < 0.0001$ ] e CA3 (figura 21, painel D e E) [ $p < 0.0003$ ] do hipocampo.



**Figura 21** – Efeitos da exposição crônica ao etanol sobre a densidade celular de CA1 e CA3 do hipocampo revelado pela coloração com violeta de cresila. Animais controle (A e C) e expostos ao EtOH (B e D). Houve diminuição do número de corpos celulares nas regiões CA1 e CA3 (E) do grupo exposto ao toxicante. Resultados expressos em média e o erro padrão da média (EPM) de cada grupo. \*Diferença significativa em relação ao controle; Teste *t* de *Student*, significante quando  $p < 0,05$ . Escala de 100  $\mu\text{m}$ .

---

---

## **V DISCUSSÃO**

---

---

## 5 DISCUSSÃO

O consumo de EtOH é um hábito comum e difundido em diversas sociedades os danos inerentes a esta ingestão tornou-se alvo de diversos estudos a fim de compreender os mecanismos pelos quais seus efeitos deletérios afligem diversos sistemas e órgãos e, primordialmente o SNC (LEE et al. 2009; CASTROAND et al. 2012). Um percentual significativo destas pesquisas revela que este hábito está sendo iniciado precocemente, na adolescência, no decorrer dos anos, pois este grupo de indivíduos tendem a consumir cronicamente esta droga, representando um público vulnerável aos danos a longo prazo, como processos neurotóxicos e transtornos inerentes a esse consumo (CREWS et al. 2000; FLEMING, et al.2012).

Neste trabalho, o modelo de exposição crônica que representasse a faixa temporal deste estudo foi elaborado obedecendo a estudos anteriores que permitia a equivalência entre a idades dos animais, o período de exposição ao EtOH e ingestão alcoólica diária aplicada (6,5g/kg/dia) (MAIER e WEST, 2001; MAIA et al. 2009; MCCUTCHEON e MARINELLI, 2009;).

Para avaliação comportamental, foram adotados os modelos do campo aberto, da esQUIVA inibitória e reconhecimento social para avaliação mnemônica (PANDOLFO, 2007; IZQUIERDO, 2002; PREDIGER, 2003) e análise histopatológica com violeta de cresila da região alvo desta investigação validadas em diversos ensaios (DOS SANTOS et al. 2007; LIMA et al. 2008; GUIMARAES et al. 2010).

Os resultados obtidos neste estudo revelaram que a exposição crônica ao EtOH foi capaz de produzir alterações comportamentais afetando aspectos referentes à atividade locomotora espontânea, emocionalidade/ansiedade, prejuízos motores constatados na redução dos parâmetros analisados no campo aberto. O grupo exposto ao EtOH demonstrou menor locomoção total em relação ao grupo controle, assim como diminuição nos parâmetros do percentual na deambulação central e no tempo gasto nesta área do aparato, sugerindo possível efeito ansiogênico. Observou-se aumento no número de levantamentos, o qual relaciona-se com atividade exploratória e ansiedade(PEREIRA, et al.2005; LEUSSIS e BOLIVAR, 2006).

Caracterizada como a função cerebral fundamental responsável pela retenção e recuperação de informações, ou seja, pela persistência da aprendizagem em

determinado espaço de tempo, a memória, segundo diversos estudos e possui uma classificação, dentre as quais se menciona aquelas descritas como sendo de curta, longa duração e imediata. A memória de reconhecimento social é identificada como sendo também de curto prazo (IZQUIERDO, 1999; 2000; LINDEN, 2007, 2009).

Noteste para avaliação de memória de reconhecimento social, de curta e longa duração obteve-se claro comprometimento no desempenho dos animais expostos cronicamente ao EtOH ao serem comparados com o grupo controle. No teste de reconhecimento social, na primeira exposição, os animais controle empregaram um maior tempo na investigação do rato juvenil em detrimento daqueles expostos cronicamente ao EtOH, porém, em um segundo momento, 30 minutos após a primeira exposição, o EtOH mostrou ser um agente perturbador da formação deste tipo de memória, pois os animais expostos a esta droga empregaram maior tempo de investigação ao rato juvenil, demonstrando assim dificuldade de retenção de memória (CHIN et al. 2010; FLEMING et al. 2012). PREDIGER et al. (2003), apontam o EtOH como facilitador dos processos mnemônicos na memória social, porém, a exposição foi aguda e a dose foi inferior a utilizada neste trabalho, o qual utilizou doses elevadas e um período de exposição prolongado, durante toda a adolescência do animal.

Ainda observando a avaliação mnemônica, ao serem submetidos à esQUIVA inibitória, em que se utiliza um estímulo aversivo para obtenção de aprendizagem (IZQUIERDO, 1999; 2002) para mensuração da memória de curta duração, os animais apresentaram diminuição no tempo de descida da plataforma sugerindo dificuldade de retenção de memória, como descrito por Maia et al. (2009) em seu estudo. Tal comportamento foi reproduzido pelo referido grupo, na avaliação de memória de longa duração, realizada vinte e quatro horas após o procedimento LB2 corroborando com os ensaios de Alberini (2005), Bevilaqua et al. (2006) e Wouda et al. (2010) acerca da vulnerabilidade de memórias frente a substâncias de abuso, as quais desempenham um papel perturbador nos mecanismos relacionados a formação de memória.

Nesta pesquisa, os achados na análise histológica violeta de cresila, demonstraram alteração na população celular do hipocampo que ratificam o que anteriormente foi descrito na literatura. Um acúmulo de evidências indicam que o

hipocampo adolescente é altamente suscetível à ação do EtOH induzindo danos estruturais e comportamentais (JUSTIN, 2011).

Os efeitos deletérios do EtOH sobre o SNC já foram demonstrados por outros autores (TAGLIAFERRO et al. 2002; CREWS e NIXON, 2009), evidenciando perda neuronal e modificações nos demais componentes, o que por conseguinte induz alteração em sua fisiologia, estrutura e função (ABREU-VILLAÇA et al. 2007, 2008). Considerando a importância do sistema nervoso, qualquer alteração em sua constituição, estrutura tecidual e conseqüentemente nos grupos celulares neurais e gliais que o compõe, comprometerá o delicado equilíbrio existente sobre as influências excitatórias e inibitórias gerando alteração nos vários sistemas do organismo (KUBOTA et al., 2001; SULLIVAN e PFEFFERBAUM, 2005). A exposição ao EtOH durante a adolescência produz um aumento significativo na morte celular por apoptose em regiões do hipocampo e esta morte de células é associada com redução das densidades de neurônios e células gliais (ABREU-VILLAÇA et al. 2007, 2008; OLIVEIRA, 2010).

A análise dos resultados obtidos sugere que a intoxicação por EtOH em ratos adultos jovens durante 55 dias com a dose considerada elevada alterou a população de grupos celulares nas regiões CA1 e CA3 no hipocampo.

Heike et al. (1997), ao realizar seu estudo sobre a reação de astrócitos e neurônios durante a exposição crônica ao EtOH, verificou que os grupos celulares hipocámpais foram afetados de forma variável, constatando que o grau de danos eram atrelados ao tempo de exposição, sendo que os grupos de 4 semanas de intoxicação não apresentavam alterações significativas, porém com aumento do tempo de exposição para 12 e 36 semanas, as alterações mostravam-se mais significativas. Este mesmo estudo revelou alteração astrocitária, com hipertrofia de astrócitos, também correspondente ao tempo de exposição.

Como descrito em outro trabalho, a exposição em longo prazo por EtOH provocou diminuição na densidade neuronal e de células gliais, mostrando um decréscimo na reatividade da proteína ácida fibrilar glial (GFAP) verificada por um marcador específico de GFAP (proteína constitutiva do citoesqueleto de astrócito), o Anti-GFAP (XU et al. 2003).

Em outra investigação, Maia et al. (2009) como resultado de seu estudo envolvendo intoxicação por EtOH e metilmercúrio, observou que as proles adultas de ratas contaminadas com esses neurotóxicos no período pré-natal apresentaram

alterações comportamentais, sugerindo uma estreita correlação entre a intoxicação por EtOH com déficit na aquisição de aprendizado, bem como na retenção da memória de longa e curta duração e no comportamento sugestivo da emocionalidade.

O cérebro é claramente plástico no período da puberdade e na trajetória de seu desenvolvimento ocorrem diversas transformações que irão perdurar por toda a vida, tais processos são notáveis antes e imediatamente após nascimento, incluindo o período de transição da infância a adolescência com extensão a fase adulta, tais mudanças resultam em diferentes períodos críticos e sensíveis ao seu amadurecimento, portanto nestes momentos perturbações positivas ou negativas interferem na estrutura e função final de forma diferente do cérebro maduro (ANDERSEN et al. 2000; ANDERSEN, 2003). Desta forma, sendo o hipocampo caracterizado por ser uma estrutura fundamental para aprendizado e memória, alterações em suas populações celulares, podem desencadear possíveis danos nos processos de memória, aprendizado e comportamento (GAZZANIGA et al. 2006). Sendo assim, a alteração na densidade celular podem justificar as alterações comportamentais e cognitivas observadas nesta investigação.

Vale ressaltar, que muitos estudos buscam elucidar o papel desempenhado por agentes psicoativos, como e quais estruturas estão vulneráveis às suas ações, que consequências há e como se comporta o SNC em desenvolvimento diante de tais estímulos nocivos. Muitos são os mecanismos propostos, porém todos apontam para o papel deletério destes agentes, no qual o EtOH está inserido.

---

---

## **VI CONCLUSÃO**

---

---

## 6 CONCLUSÃO

A exposição ao EtOH da adolescência a fase adulta interferiu de forma significativa no comportamento ocasionado alterações na deambulação natural do animal, no desenvolvimento de comportamento do tipo ansiogênico, além de interferir nos processos mnemônicos, com impacto nas memórias de curta e longa duração e na de reconhecimento social, que são comportamentos dependentes de estruturas do sistema límbico, no qual o hipocampo está inserido. Tais alterações comportamentais e cognitivas foram acompanhadas de alterações na densidade celular hipocampal dos ratos expostos ao EtOH demonstrando a vulnerabilidade desta estrutura a este toxicante. No entanto, os mecanismos pelos quais tais alterações ocorrem devem ser alvo de estudos posteriores, para melhor compreensão dos efeitos do consumo excessivo de EtOH em um período caracterizado por mudanças significativas e definitivas no cérebro, que corresponde à adolescência.

---

---

## VII REFERÊNCIAS

---

---

## 7 REFERÊNCIAS

**ABREU-VILLAÇA, Y.** hippocampal increased cell death and decreased cell density elicited by nicotine and/or ethanol during adolescence are reversed during drug withdrawal. **Neuroscience.2010:167:163-173.**

**ACHESON SK, STEIN RM, SWARTZWELDER)** Impairment of semantic and figural memory by acute ethanol age-dependent effects. **Alcohol Clin Exp Re. 1998: 22:1437–1442.**

**AGUIAR, M. S. S.** Análise do Comportamento Defensivo Induzido pela Microinjeção do Neuropeptídeo Substância P na Matéria Cinzenta Periaquedutal Dorsal de Ratos. **Departamento de Psicologia e Educação, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo, 1995.**

**ALBERINI, C. M.** Mechanisms of memory stabilization: are consolidation and reconsolidation similar or distinct processes? **Trends Neurosci.2005: 28: 51–56.**

**ANDERSEN, S. L.** Trajectories of brain development: point of vulnerability or window of opportunity?. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews.2003:27:3–18.**

**ANDERSEN, S.L; THOMPSON, A.T; RUTSTEIN, M; HOSTETTER, J.C; TEICHER, M.H.** Dopamine receptor pruning in prefrontal cortex during the periadolescent period in rats. **Synapse: 2000;37(2):167–9.**

**ANTHONY, J.C; VAN ETEN, M.L.** Epidemiology And Its Rubrics: **A. Bellack & M. Hersen (Eds.). (Vol 1) Comprehensive Clinical Psychology. Oxford, UK: Elsevier Science Publications. 1998, pp.355-390.**

**BAKER, K.B, KIM J.J.** Effects of stress and hippocampal NMDA receptor antagonism on recognition memory in rats. **Learn. 2002: 9:58–65.**

**BANCO MUNDIAL.** Gender Dimensions of Alcohol Consumption and Alcohol Related Problems in Latin America and the Caribbean, **2002.**

**BAYLEY PJ, SQUIRE LR (2003).** The medial temporal lobe and declarative memory. **International Congress Series 1250:245-259.**

**BEAR, M; CONNORS, B; PARADISO;** Michael. Neurociências: Desvendando o Sistema Nervoso. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2002.

**BEVILAQUA, L. R; BONINI, J. S; ROSSATO, J; IZQUIERDO, I; CAMMAROTA, M.** The entorhinal cortex plays a role in extinction. **Neurobiol. Learn. Mem. 2006: 85: 192–197.**

**BLISS,T.V.;COLLINGRIDGE,G.L.** A synaptic model of memory: Long-term potentiation in the hippocampus. **Nature 1993; 361:31-39.**

**BRODAL, A.** Anatomia neurológica com correlações clínicas. **São Paulo: Roca, 1997.**

**BUFFO, A; ROLANDO, C; CERUTI, S;**Astrocytes in the damaged brain: Molecular and cellular insights into their reactive response and healing potential. **Biochemical Pharmacology.2010.79:77-89.**

**CAMMAROTA ,M;; BEVILAQUA, L.R JANINE I;RAMON,R; IZQUIERDO,I.** Parallel memory processing by the CA1 region of the dorsal hippocampus and the basolateral amygdala. **National Academy of Sciences, PNAS :29:105:30 10279–10284 2008.**

**CARLINI, E. A.** Drogas Psicotrópicas: III Levantamento Sobre levantamento de Drogas entre Meninos e Meninas em Situação de Rua em Cinco Capitais Brasileiras, 1993. **Centro Brasileiro de Informação sobre drogas Psicotrópicas – Departamento de Psicobiologia – Escola Paulista de Medicina, 1994. pp. 93-97.**

**CARLINI, E.A.; GALDURÓZ, J.C.F.; NOTO, A.R.; NAPPO, A.S.** I levantamento domiciliar sobre o uso de drogas psicotrópicas no Brasil. **São Paulo: Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas (CEBRID). Secretaria Nacional Antidrogas (SENAD); 2002.**

**CASTROAND, D. S; SANCHEZB, Z. M; ZALESKIA, M; ALVES, H. N.P; PINSKYA,L; CAETANO, R; LARANJEIRA R. R.** Socio demographic characteristics associated with binge drinking among Brazilians. **Drug and Alcohol Dependence.2012:4460: 5.**

**CEBRID - Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas.** II Levantamento Domiciliar sobre o uso de drogas psicotrópicas no Brasil: estudo envolvendo as 108 maiores cidades do país. **São Paulo: Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas (CEBRID) e Secretaria Nacional Antidrogas (SENAD); 2007.**

**CEBRID.** II Levantamento Domiciliar sobre o Uso de Drogas Psicotrópicas no Brasil: estudo envolvendo as 108 maiores cidades do país: 2005 / E. A. Carlini (supervisão) et. al. **São Paulo: CEBRID - Centro Brasileiro de Informação sobre Drogas Psicotrópicas: UNIFESP - Universidade Federal de São Paulo, 2006.**

**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.2010: 44:3-14.**

**CREWS, F. T.; BRAUN, C. J.; HOPLIGHT, B.; SWITZER III, R. C.; KNAPP, D. J.** Binge Ethanol Consumption Causes Differential Brain Damage in Young Adolescent Rats Compared With Adult Rats. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. **2000; 24: 1712-1723.**

**CREWS, F.T.; NIXON, K.** Mechanisms of Neurodegeneration and Regeneration in Alcoholism. *Alcohol & Alcoholism* Vol. **44, No. 2, pp. 115–127, 2009.**

**DANTZER,R; BLUTHÉ, RM, KOOB, GF, LE MOAL M.** Modulation of social memory in male rat neurohypophyseal peptides.*Psychopharmacology* **91: 363-368, 1987.**

**DAVIES, M.** The role of GABAA receptors in mediating the effects of alcohol in the central nervous system. *J. Psychiatry. Neurosci.* **2003; 28: 263-74.**

**FADA, F.; ROSSETTI, Z.L.** Chronic ethanol consumption: from neuroadaptation to neurodegeneration. *Progress in Neurobiology*, **56, pp. 385 - 431, 1998.**

**FEHR, C.; SANDER, T.; TADIC, A.; LENZEN, K.P.; ANGHELESCU, I.; KLAWE, C.; DAHMEN, N.; SCHMIDT, L.G.; SZEGEDI, A.** Confirmation of association of the GABRA2 gene with alcohol dependence by subtype-specific analysis. *Psychiatr Genet.* **2006;16: 9-17.**

**FLEMING, R. L; ACHESON, S. K; MOORE S.D; WILSON, W. A; SWARTZWELDER, H.S.** In the Rat, Chronic Intermittent Ethanol Exposure During Adolescence Alters the Ethanol Sensitivity of Tonic Inhibition in Adulthood. *Alcohol Clin Exp.* **2012;36:2: 279–285.**

**FRANKE, H.** Influence of chronic alcohol treatment on the GFAP immunoreactivity in astrocytes of the hippocampus in rats. *Acta Histochem*, **1995 :97: 263-271.**

**GAZZANIGA, M; IVRY, R; MAGNUN, G.** *Neurociência Cognitiva: a biologia da mente. 2.ed. Porto Alegre: Artmed, 2006.*

**GILMAN, J. M., RAMCHANDANI, V. A., DAVIS, M. B., BJORK, J. M; HOMMER, D. W.** Why we like to drink: a functional magnetic resonance imaging study of the rewarding and anxiolytic effects of alcohol. *The Journal of Neuroscience*,**2008. 28(18):4583-91.**

**GOMES-LEAL, W.; CORKILL, D.J.; FREIRE, M.A; PICANÇO-DINIZ, C.W.;PERRY, V. H.** Astrocytosis, microglia activation, oligodendrocyte degeneration, and pyknosis following acute spinal cord injury. *Experimental Neurology*. **2004:190:2, 456-467.**

**GUIMARÃES, J.S; FREIRE, M. A.M., LIMA R. R; PICANÇO-DINIZ,C.W; PEREIRA,A;GOMES-LEAL,W.** Minocycline treatment reduces white matter damage after excitotoxic striatal injury. *Brainresearch*.**2010:19292–193.**

**HARPER,L.** The neurotoxicity of alcohol. **Human & Experimental Toxicology.2007: 26: 251- 257.**

**HARPER,L.**The Neuropathology of Alcohol-Related Brain Damage. **Alcohol & Alcoholism.2009: 44: 2: 136–140.**

**HE, JU;CREWS, F.T.** Increased MCP-1 and microglia in various regions of the human alcoholic brain. **Experimental Neurology.2008: 210:349-358.**

**HEIKE,F; KITTNER, H; BERGER, P; WIRKNER, K; SCHRAMEK, J.** The Reaction of Astrocytes and Neurons in the Hippocampus of Adult Rats During Chronic Ethanol Treatment and Correlations to Behavioral Impairments. **Alcohol.1997: 14:5: 445-454.**

**HEILIG, M.; GOLDMAN, D.; BERRETTINI, W.; O'BRIEN, C.P.** Pharmacogenetic approaches to the treatment of alcohol addiction. **Nature Reviews Neuroscience. 2011; 12: 670-684.**

**INSIGHT® BRASIL.** Equipamento esquiva inibitória. Disponível em: <http://insightltda.com.br/insight-equipamento-cientifico-1520-Caixa-de-Esquiva-Passiva>. Acessado em: 16 mar. 2012.

**IORIO, K.R, TABAKOFF B, HOFFMAN, P.L.** Glutamate-induced neurotoxicity is increased in cerebellar granule cells exposed chronically to ethanol. **Eur J Pharmacol. 1993;248:209–12.**

**IZQUIERDO I.**Different molecular cascades in different sites of the brain control memory consolidation. **Trends Neurosci .2006. 29:496–505.**

**IZQUIERDO, I; MEDINA, H.J.** Memory Formation: The Sequence of Biochemical Events in the Hippocampus and Its Connection to Activity in Other Brain Structures. **Neurobiology of learning and memory.1998:68:285–316.**

**IZQUIERDO, I; MEDINA, H.J.** Separate mechanisms for short- and long-term memory. Behavioural.**Brain Research. 1999: 103:1–11.**

**IZQUIERDO,I; MCGAUGH, J.L.**Behavioural pharmacology and its contribution to the molecular basis of memory consolidation.**Behavioural Pharmacology.2000:11:517-534.**

**JUNG, M.E.; GATCH, M.B.; SIMPKINS, J.W.** ESTROGEN NEUROPROTECTION AGAINST THE NEUROTOXIC EFFECTS OF ETHANOL WITHDRAWAL: POTENTIAL MECHANISMS. **Exp. Biol. Med. (Maywood) 2005; 230: 8–22.**

**JUNG, S.; AKABAS, M.H; HARRIS, R.A.** Functional and structural analysis of the GABAA receptor  $\alpha$ 1 subunit during channel gating and alcohol modulation. **J. Biol. Chem.**; 2005, **280**: 308-316.

**KANDEL, E.; SCHWARTZ, J.; JESSELL, T.** Fundamentos da Neurociência e do Comportamento. **Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997.**

**KUBOTA, M.; NAKAZAKI, S.; HIRAI, S.** Alcohol consumption and frontal lobe shrinkage: study of 1432 non-alcoholic subjects. **J Neurol Neurosurg Psychiatry.** 2001;**71**:104–6.

**KUMAR, S.; PORCU, P.; WERNER, D.; MATTHEWS, D.; DIAZ-GRANADOS, J.; HELFAND, R.; MORROW, A.** The role of GABA receptors in the acute and chronic effects of ethanol: a decade of progress. **Psychopharmacology.** 2009; **205**: 529-564

**LEE, H; ROH, S; KIM,D. J.** Alcohol-Induced Blackout. **Int. J. Environ. Res. Public Health** 2009(**6**): 2783-2792.

**LENT, R.** Cem Bilhões de Neurônios: Conceitos Fundamentais de Neurociências. **2. Ed. São Paulo: Atheneu, 2010.**

**LEUSSIS, M.P; BOLIVAR, V.J.** Habituation in rodents: a review of behavior, neurobiology, and genetics. **Neurosci. Biobehav.** 2006;**30**:1045–1064

**LINDEN, D.E.J.** The Working Memory Networks of the Human Brain. **The Neuroscientist.**2007;**13**: 257.

**LOVINGER D. M.** Excitotoxicity and alcohol-related brain damage. **Alcohol. Clin Exp Res.** 1993;**17**:19–27.

**LOVINGER, D.M.** 5-HT<sub>3</sub> receptors and the neural actions of alcohols: an increasingly exciting topic. **Neurochem Int.**; 1999; **35**: 125–130.

**LUCENA, G. M. R. S** Efeitos da Cipura paludosa nos déficits comportamentais de ratos adultos expostos ao Etanol e/ou metil mercúrio durante o desenvolvimento do SNC. **2010. 29-40 f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, 2010.**

**MAIA, C. S. F.** Efeitos do etanol e/ou metilmercúrio no desenvolvimento do sistema nervoso central: Alterações morfológicas e comportamentais em ratos adultos. **2009. 5.63 f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, 2009.**

**MAIA, C.S.F.; LUCENA, G.M.R.S.; CORRÊA, P.B.F.; SERRA, R.B.; MATOS, R.W.M.; MENEZES, F.C.; SANTOS, S.N.; SOUSA, J.B. COSTA, E.T.; FERREIRA, V.M.M.** Interference of ethanol and methylmercury in the developing central nervous system. **Neurotoxicology**. 2009; 30: 23-30;

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

**MARKWIESE, B.J; ACHESON, S.K, LEVIN, E.D, WILSON,W A, SWARTZWELDER. H. S.**Differential effects of ethanol on memory in adolescent and adult rats. **Alcohol Clin**. 1998;22:416–421.

**MCCLAIN, J. A; MORRIS,S. A; DEENY, M. A; S; MARSHALL, A; HAYES, D. M;KISER, Z. M; NIXON, K.** Adolescent binge alcohol exposure induces long-lasting partial activation of microglia. .2011;25:120-128.

**MINISTÉRIO DA SAÚDE.** Apolítica do ministério da saúde para atenção integral a usuários de álcool e outras drogas: **Série B. Textos Básicos de Saúde 2. ed. Brasília, 2004.**

**MINISTÉRIO DA SAÚDE.** Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico. **Vigitel Brasil 2007.**

**MORIOKA, T., KALEHUA, A. N., & STREIT, W. J.** The microglial reaction in the rat dorsal hippocampus following transient forebrain ischemia. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism** 1991;11: 966–973.

**NICHOLS, N. R., DAY, J. R., LAPING, N. J., JOHNSON, S. A.; FINCH, C. E.** GFAP mRNA increases with age in rat and human brain. **Neurobiol Aging**.1993: 4:5:421-9.

**NORENBERG, M. D.** Astrocyte responses in CNS injury. **J Neuropathol Exp Neurol**. 994. 53:3:213-20.

**North West Public Health Observatory.** Local Alcohol Profiles for England 2011. <http://www.lape.org.uk/natind.html> (acesso em 16 de julho de 2012).

**OFORI-ADJEI,D; CASSWELL,S;, DRUMMOND C.**World Health Organization Expert Committee on Problems Related to Alcohol Consumption, Second Report. Geneva: **WHO; 2007.**

**OLIVEIRA-DA-SILVA, A; MANHÃES, A.C; RODRIGUES,F.C; FILGUEIRAS, C. C;**  
**PANDOLFO P, PAMPLONA FA, PREDIGER RD, TAKAHASHI RN.** Increased sensitivity of adolescent spontaneously hypertensive rats, an animal model of attention deficit hyperactivity disorder, to the locomotor stimulation induced by the cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2. **Eur J Pharmacol** 2007; 563: 141-148;

PANICKAR, K. S., NOREMBERG, M. D. Astrocytes in cerebral ischemic injury: morphological and general considerations. **Glia** 50:287-298, 2005.

PEREIRA, G.S.; ROSSATO, J.I.; SARKIS, J.J.F.; CAMMAROTA, M.; BONAN, C.D.; IZQUIERDO. Activation of adenosine receptors in the posterior cingulate cortex impairs memory retrieval in the rat. **Neurobiol. Learn. Mem.** 2005: 83: 217-223.

PREDIGER, R. D. S., BATISTA, L. C., MIYOSHI, A., TAKAHASHI, R. N. Facilitation of short-term social memory by ethanol in rats is mediated by dopaminergic receptors. **Behavioural Brain Research.**2004; 149–157.

RAIVICH, G., BOHATSCHK, M., KLOSS, C.U., WERNER, A., JONES, L.L.; KREUTZBERG, G.W. Neuroglial Activation Repertoire in the Injured Brain: Graded Response, Molecular Mechanisms and Cues to Physiological Function. **Brain Research Reviews.** 1999: 30:77-105.

RANSOM, B.; BEHAR, T.; NEDERGAARD, M. New roles for astrocytes (stars at last). Trends in Neurosciences. 2003:26:10.

REBEKAH, L; FLEMING; SHAWN, K.; ACHESON;SCOTT, D; MOORE;WILKIE A.WILSON,H. SCOTT SWARTZWELDER. In the Rat, Chronic Intermittent Ethanol Exposure During Adolescence Alters the Ethanol Sensitivity of Tonic Inhibition in Adulthood. Alcoholism. **Clinical and Experimental Research.** 2012:36.

REHM, J,;MATHERS, C; POPOVA, S.Global burden of disease and injury and economic cost attributable to alcohol use and alcohol-use disorders. **Lancet** 2009;373:2223-33.

REZAYAT, M; NIASARI,H; AHMADI, S; PARSAEI, L; ZARRINDAST, M.R. N-methyl-D-aspartate receptors are involved in lithium-induced state-dependent learning in mice. **Journal of Psychopharmacology.**2010: 24:6:915–921

ROOM , R. International control of alcohol: alternative paths forward. **Drug Alcohol.** 2006: 25:6::581-95.

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

SOLLIVAN, E.V. Compromised pontocerebellar and cerebellothalamocortical systems: speculations on their contributions to cognitive and motor impairment in nonamnesic alcoholism. **Alcohol Clin Exp.**2003. 27:1409–19.

**SQUIRE, L. R., KANDEL, E. R.** Memória: Da mente às moléculas. Porto Alegre: Editora Artmed, 2003.

**SQUIRE, L.R.** Memory and hippocampus: a synthesis of findings whit rats, monkey and humans. *Phychol rev.* 1995: 99:195-221.

**TAGLIAFERRO, P.; DUHALDE V. M.; EVRARD, S G.; RAMOS, A. J.; BRUSCO, A.** Alcohol Exposure During Adulthood Induces Neuronal and Astroglial Alterations in the Hippocampal CA-1.*New York Academy of Sciences.* 2002: 935:334 – 342.

**THOMSON, A.D;GUERRINI, I; BELL, D; DRUMMOND, C; DUKA, T; FIELD, M;. KOPELMAN, M; LINGFORD-HUGHES, A; SMITH, I.; WILSON,K;MARSHALL, E.J.** Alcohol-Related Brain Damage: Report from a Medical Council on Alcohol Symposium, June 2010. *Alcohol and Alcoholism.*2012:47:2:84-91.

**WORLD HEALTH ORGANIZATION.** Global strategy to reduce the harmful use of alcohol . **WHO – 2010.**

**WOUDA, J. A; DIERGAARDE, L; RIGA,D; MOURIK, Y.V; SCHOFFELMEER, A. N. M; DE VRIES, T. J.** Disruption of long-term alcohol-related memory reconsolidation: role of  $\beta$ -adrenoceptors and nmda receptors. *Frontiers in Behavioral Neuroscience.*2010:4:179.

**XU, Z.; F.J. SEIDLER, C.A.; TATE, S.J.; GARCIA, W.; SLIKKER Jr;SLOTKIN T.A.,**Sex-selective hippocampal alterations after adolescent nicotine administration: effects on neuro specific proteins, *Nicotine. Tob.* 2003: 5: 955–960.

**YONG, V.W.; WELLS, J.; GIULIANI, F.; CASHA, S.; POWER, C.; METZ, L.M.** The promise of minocycline in neurology. *The Lancet Neurology.* 2004; 3: 744-751.

---

---

**VIII ANEXO**

---

---



**PARECER BIO007-09**

**Projeto:** Efeitos Neurocomportamentais e Neuroprotetores na recuperação funcional após bloqueio da ativação microglial com minociclina em ratos submetidos à isquemia focal no cortex motor quando tratados cronicamente com etanol da adolescência à fase adulta

**Coordenador:** Prof. Dra Cristiane do Socorro Ferraz Maia

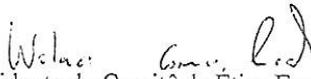
**Área Temática:** Biologia

**Vigência:** 01/2009 a 01/2011

**Nº no CEPAE-UFPA:** BIO001-09

O projeto acima identificado foi avaliado pelo Comitê de Ética Em Pesquisa Com Animais de Experimentação da Universidade Federal do Pará (CEPAE). O tema eleito para a investigação e de alto teor científico justificando a utilização do modelo animal proposto. Os procedimentos experimentais utilizados seguem as normas locais e internacionais para tratamento e manipulação de animais de experimentação. Portanto, o CEPAE, através de seu presidente, no uso das atribuições delegadas pela portaria Nº 1568/2005 do Reitor da Universidade Federal do Pará, resolve **APROVAR** a utilização de animais de experimentação nas atividades do projeto em questão, no período de vigência estabelecido. As atividades experimentais fora do período de vigência devem receber nova autorização deste comitê.

Belém, 01 de janeiro de 2009

  
Presidente do Comitê de Ética Em Pesquisa  
Com Animais de Experimentação da Universidade  
Federal do Pará