

**ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO – UNIFESP
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

THAMIRES RIGHI

**EFEITOS DA INTOXICAÇÃO ALCOÓLICA DURANTE A ADOLESCÊNCIA E DO
EXERCÍCIO FÍSICO DURANTE A ABSTINÊNCIA PROTRAÍDA SOBRE O
COMPORTAMENTO E AS ALTERAÇÕES MOLECULARES NO HIPOCAMPO DE
CAMUNDONGOS *SWISS***

SÃO PAULO

2024

THAMIRES RIGHI

**EFEITOS DA INTOXICAÇÃO ALCOÓLICA DURANTE A ADOLESCÊNCIA E DO
EXERCÍCIO FÍSICO DURANTE A ABSTINÊNCIA PROTRAÍDA SOBRE O
COMPORTAMENTO E AS ALTERAÇÕES MOLECULARES NO HIPOCAMPO DE
CAMUNDONGOS *SWISS***

Tese apresentada à Universidade Federal de
São Paulo – Escola Paulista de Medicina, para
obtenção do título de Doutora em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Cardoso Cruz

SÃO PAULO

2024

Righi, Thamires.

EFEITOS DA INTOXICAÇÃO ALCOÓLICA DURANTE A ADOLESCÊNCIA E DO EXERCÍCIO FÍSICO DURANTE A ABSTINÊNCIA PROTRAÍDA SOBRE O COMPORTAMENTO E AS ALTERAÇÕES MOLECULARES NO HIPOCAMPO DE CAMUNDONGOS *SWISS* / Thamires Righi. – 2023. – Pag. São Paulo, 2023.

Tese (Doutorado em Farmacologia). – Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-graduação em Farmacologia.

Orientador: Dr. Fábio Cardoso Cruz.

Effects of alcohol intoxication during adolescence and physical exercise during prolonged abstinence on behavior and molecular alterations in the hippocampus of *Swiss* mice.

1. Etanol. 2. Intoxicação. 3. Exercício físico.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA
FARMACOLOGIA

Chefe do Departamento de Farmacologia
Profª. Dra. Miriam Galvonas Jasiulionis

Coordenador do Programa de Pós-graduação em Farmacologia
Prof. Dr. Ruy Ribeiro de Campos Júnior

Vice-coordenadora do Programa de Pós-graduação em Farmacologia
Profª. Dra. Regina Helena da Silva

THAMIRES RIGHI

**EFEITOS DA INTOXICAÇÃO ALCOÓLICA DURANTE A ADOLESCÊNCIA E DO
EXERCÍCIO FÍSICO DURANTE A ABSTINÊNCIA PROTRAÍDA SOBRE O
COMPORTAMENTO E AS ALTERAÇÕES MOLECULARES NO HIPOCAMPO DE
CAMUNDONGOS *SWISS***

Aprovado em: 01 de março de 2024

Profª. Dra. Daniela Baptista de Souza
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita (UNESP)

Prof. Dr. Rodrigo César Rorato
Universidade Federal de São Paulo.

Prof. Dr. Tarciso Tadeu Miguel
Universidade Federal de Uberlândia

Prof. Dr. Rodrigo Molini Leão
Universidade Federal de Uberlândia

Dedico este trabalho aos meus pais, à minha
esposa e aos meus amigos, pelo incentivo,
carinho e compreensão.

AGRADECIMENTOS

Para aqueles que escolheram ou escolherão esse caminho, não foi e não é uma jornada fácil! A dúvida, incerteza, falta de incentivo e investimento e falta de um programa de carreira sempre aparecem para nos assombrar. Entretanto, no final, ao olhar para os seus resultados e saber que foi você, a sua dedicação, a sua coragem, a sua luta e a sua persistência quem os construiu, faz tudo ter valido a pena! Realmente são poucos os que chegam até aqui!

Como nenhuma trajetória é percorrida sozinha, agradeço a todas as pessoas que direta ou indiretamente me apoiaram, sendo no desenvolvimento e execução deste projeto ou em minha vida pessoal. Com certeza muitas dificuldades e muitos obstáculos foram superados para chegar até aqui!

Em primeiro lugar agradeço a Deus/Universo pela minha vida e por me mostrar, através de seus sinais subjetivos, que eu nunca estive sozinha. Obrigada pela criação da natureza e das praias e por disponibilizá-las como refúgio e lar dos meus pensamentos durante momentos difíceis.

Agradeço à minha família, em especial aos meus pais e esposa, que sempre acreditaram e confiaram em mim, mesmo quando eu não acreditava e não confiava. Obrigada por sempre me mostrarem que eu posso ir além, mesmo quando eu acho que já atingi o meu limite. Agradeço ao meu irmão e às minhas cunhadas, por sempre me verem como inspiração aos seus filhos. Agradeço aos meus sobrinhos por sempre me mostrarem que o mundo, nos olhos e na pureza das crianças, pode ser um lugar melhor para todos! Em especial, agradeço ao meu sobrinho Iago pelo companheirismo, carinho e credibilidade: você sempre diz que se inspirou em mim para se formar em farmácia, mas a sua inteligência, genialidade e lealdade são inspirações para mim! Agradeço aos meus amigos por todos os momentos que vivemos juntos e por terem transformado todos os roês em eternas memórias!

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Fábio Cardoso Cruz por ter confiado em mim e ter aberto as portas do seu laboratório para que eu pudesse colocar em prática as minhas ideias. Mas, acima de tudo, agradeço ao Fábio por ser esse ser humano inteligentíssimo, e admirável, que se preocupa com as pessoas e com seus sentimentos, que está aberto para conversas e sempre disposto a ajudar. Agradeço pelos ensinamentos, incentivo, compreensão, orientação, confiança e, em alguns momentos, pela paciência em me ouvir e ouvir minhas reclamações.

Agradeço aos meus amigos e companheiros de laboratório, por sempre estarem dispostos a ajudar, seja nos experimentos, seja nas queixas sobre a vida pessoal: Paula, Lucas, Natalia, Cris, Paola, Alexa, Gabi, Thais, Augusto, Talita, Adolfo, Ingrid, Gustavo, Alexandre

Kanashiro, Matheus, Bryan e todos que fizeram parte dessa jornada. Obrigada Gabi, por toda a sua ajuda na estatística; sem você, seria impossível terminar essa tese! Obrigada às técnicas Nice e Nilma por tudo que fizeram e ainda fazem para manter o laboratório pronto para fazer ciência e por todas as nossas conversas e ajuda nos experimentos.

Agradeço ao professor Dr. Gustavo por ceder seu laboratório e compartilhar seus protocolos para que eu pudesse fazer todas as técnicas de western blotting. Agradeço ao professor Dr. Alexander Birbrair por aceitar me receber em seu laboratório nos Estados Unidos, durante o meu estágio sanduíche.

Agradeço a CAPES, CAPES-PRINT, FAPESP e CNPq pelo apoio financeiro.

Obrigada!

“Onde houver Dúvida, que eu leve a Fé”

(Oração de São Francisco de Assis)

“O que eu amo na ciência é que o quanto mais aprendemos menos respostas conseguimos. O máximo que conseguimos são perguntas melhores!”

(Tartarugas até lá embaixo- John Green)

RESUMO

As modificações funcionais cognitivas e comportamentais ocorridas durante a adolescência tornam os adolescentes mais predispostos a iniciarem o uso de etanol ou outras drogas. Alterações nos sistemas relacionados ao estresse crônico, aos processos neuroinflamatórios e às vias de autofagia e neuroplasticidade podem mediar a transição do uso ocasional para o uso compulsivo. O uso de terapias alternativas, como o exercício físico, tem sido um grande aliado no tratamento da dependência e dos problemas neurológicos a ela associados, como por exemplo, os sintomas negativos associados à síndrome de abstinência. Dessa forma, o presente estudo investigou as alterações no padrão de consumo de camundongos *Swiss* submetidos a diferentes protocolos de intoxicação de etanol, alterações na expressão do BDNF e mTORC, de células da glia, das proteínas autofágicas e nos testes comportamentais decorrentes da interação entre intoxicação de etanol na adolescência e exercício físico forçado durante a fase de abstinência protraída na região do hipocampo desses animais. Observamos que os animais intoxicados por etanol, no modelo de administração intraperitoneal, apresentaram redução no peso corporal durante a intoxicação e aumento na expressão de CRF após a exposição ao etanol e ao exercício físico. Os animais intoxicados por etanol, no modelo cíclico de exposição ao vapor de etanol, apresentaram redução no peso corporal e aumento no consumo voluntário na segunda semana de exposição ao etanol. O isolamento social associado ao modelo de exposição crônica estendida ao vapor de etanol diminuiu a evocação da memória de longo prazo, aumentou os comportamentos tipo depressivos e diminuiu a expressão das proteínas mTOR e BDNF no hipocampo desses animais. O exercício físico aumentou o desempenho no teste de velocidade máxima e a cognição dos animais. Concluiu-se que o consumo excessivo e a intoxicação crônica de ETOH foram fortes preditores para o aparecimento tardio de transtornos relacionados ao uso dessa substância, assim como danos neurocognitivos persistentes.

Palavras-chave: Etanol; Exercício Físico; Dependência; Adolescência; Abstinência; CRF; Glia; Camundongos *Swiss*; Hipocampo; Isolamento Social; BDNF; mTORC.

ABSTRACT

The functional cognitive and behavioral changes that occur during adolescence make adolescents more predisposed to starting to use ethanol or other drugs. Changes in systems related to chronic stress, neuroinflammatory processes and autophagy and neuroplasticity pathways can mediate the transition from occasional use to compulsive use. The use of alternative therapies, such as physical exercise, has been a great ally in the treatment of addiction and the neurological problems associated with it, such as the negative symptoms associated with withdrawal syndrome. Thus, the present study investigated changes in the consumption pattern of *Swiss* mice subjected to different ethanol intoxication protocols, changes in the expression of BDNF and mTORC, glial cells and autophagic proteins in the hippocampus and in behavioral tests resulting from the interaction between ethanol intoxication in adolescence and forced physical exercise during the protracted abstinence phase. We observed that animals intoxicated by ethanol, in the intraperitoneal administration model, showed a reduction in body weight during intoxication and an increase in CRF expression after exposure of ethanol and physical exercise. Animals intoxicated with ethanol, in the cyclic model of exposure to ethanol vapor, showed a reduction in body weight and an increase in voluntary consumption in the second week of exposure to ethanol. Social isolation associated with the extended chronic exposure model to ethanol vapor decreased long-term memory recall, increased depressive-like behaviors and decreased the expression of mTOR and BDNF proteins in the hippocampus. Physical exercise increased performance in the maximum speed test and the animals' cognition. It was concluded that excessive consumption and chronic ETOH intoxication were strong predictors for the late onset of disorders related to the use of this substance, as well as persistent neurocognitive damage.

Keywords: Ethanol; Physical exercise; Dependency; Adolescence; Abstinence; CRF; Glia; *Swiss* Mice; Social isolation; Hippocampus; BDNF; mTORC.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Egípcios na colheita de uvas para a produção de vinho. Painel na Tumba de Nebamun, da XVIII dinastia egípcia, na Necrópole de Tebas	24
Figura 2. Pintura feita pelo artista Giovanni Bellini (1430-1516) intitulada: Embriaguez de Noé (traduzido do inglês: Drunkenness of Noah).	25
Figura 3. Número de pessoas (x 1000) de 12 a 65 anos que consumiram bebidas alcoólicas no Brasil. As barras representam o número de pessoas que fizeram o uso durante a vida, nos últimos 12 meses, nos últimos 30 dias e consumo tipo binge	27
Figura 4. Gráfico do Percentual de escolares de 13 a 17 anos que experimentaram bebida alcoólica alguma vez na vida (IC= 95%), por sexo, segundo as Grandes regiões- 2019.	28
Figura 5. Ilustração da estrutura química da molécula de etanol. Entende-se por "C": carbono; "O": oxigênio e "H": hidrogênio.....	35
Figura 6. Figura representativa do receptor GABA _A . O ETOH se liga na subunidade alfa, indicado na imagem como Positive Modulators.....	36
Figura 7. Figura representativa dos receptores glutamatérgicos AMPA/kainato (verde claro) e NMDA (verde escuro).	37
Figura 8. Representação esquemática da via mesocorticolímbica do encéfalo de roedores. As setas em preto indicam as vias dopaminérgicas que saem da Área tegmentar ventral (VTA) para o Núcleo accumbens (Nac), Amígdala (Amg), Hipocampo (HIP) e Córtex pré-frontal (CPF).	37
Figura 9. Ações do ETOH na VTA e no NAc. O etanol aumenta a liberação de dopamina no núcleo accumbens, principalmente por aumentar a liberação de opioides endógenos que atuam nos receptores mu-opioides e inibem a neurotransmissão gabaérgica.....	38
Figura 10. Imagem ilustrativa do hipotálamo do encéfalo de humano. Em destaque (em vermelho), os núcleos paraventriculares, região com maior concentração de neurônios parvocelulares	40
Figura 11. Figura representativa do CRF agindo na glândula pituitária e ativando a liberação do ACTH na circulação sistêmica. Ao atingir a glândula adrenal, o ACTH estimula a síntese do cortisol sistêmico.	42
Figura 12. Imagem representativa de algumas das células do SNC: neurônios (amarelo) e células da glia (oligodentrócitos, em azul; astrócito, em verde; micróglia, em marrom).	44

Figura 13. Imagem representativa da sequência de formação do autofagossomo/autolisossomo na macroautofagia (autofagia) indicando os cinco principais eventos distintos: indução, nucleação, alongamento, fusão e degradação/reciclagem	47
Figura 14. Iniciação via complexo ULK1: em condições de nutriente abundante, o complexo regulador mTORC1 reprime a ativação da autofagia através da fosforilação de um resíduo de serina em ULK1. A privação de glicose ou aminoácidos resulta na repressão da ativação do mTORC1. Consequentemente, o ULK1 fosforila outras proteínas, resultando na ativação de proteínas efetoras da autofagia a jusante	48
Figura 15. Via autofágica em mamíferos e suas proteínas reguladoras. A autofagia é iniciada pela formação de fagóforos no citoplasma. Os autofagossomos se fundem com os endossomos que em seguida se fundem aos lisossomos para formar os autolisossomos onde a carga autofágica é degradada. A autofagia pode ser controlada por vias dependente ou independente de mTORC1. A proteína LC3-II é um marcador específico da formação de autofagossomos na autofagia e é degradado nos autolisossomos, bem como a p62.....	49
Figura 16. Estrutura espacial do BDNF.....	52
Figura 17. Ilustração do mecanismo proposto por Chen et al. (2013), em que o BDNF ativa a autofagia através do mecanismo regulado pela mTORC1.	53
Figura 18. Esteira da empresa MasterOne®, utilizada para o treinamento de corrida forçada dos camundongos dos grupos exercitados	58
Figura 19. Imagem ilustrativa do sistema de vapor construído pela empresa AVS Projetos e utilizado nesse estudo.	59
Figura 20. Representação esquemática dos ciclos de administração intraperitoneal: 4 ciclos, sendo 3 dias IP (ETOH/salina) / 2 dias retirada da substância	60
Figura 21. Representação esquemática do ciclo de exposição ao etanol (câmara de vapor + IA2BC) do experimento 2 (descrito em 4.2).	63
Figura 22. Representação esquemática do ciclo de exposição ao etanol (câmara de vapor + IA2BC) do experimento 3 (descrito em 4.3).	63
Figura 23. Aparato para realização do teste LCE. Este aparato é construído em forma de cruz, elevado 54 cm do solo e consiste em dois braços abertos opostos e dois braços fechados opostos do mesmo tamanho.....	69
Figura 24. Aparato para realização do teste CA. Este aparato é construído em forma cilíndrica, e consiste em duas zonas: a zona central e a zona periférica.....	70

Figura 25. Aparato para realização do teste NORT. Este aparato é construído em forma cilíndrica e possui dois objetos inseridos em seu interior. A exploração aos objetos é livre. ..	71
Figura 26. Aparato para realização do teste de splash de sacarose. Este aparato é construído em forma cilíndrica e o animal permanece em seu interior, onde pode realizar os movimentos de grooming livremente.....	72
Figura 27. Aparato para realização do teste de RotaRod. Este aparato é construído em um cilindro rotatório no qual o animal deve se equilibrar em cima	73
Figura 28. Aparato para realização do teste de nado forçado e mensuração do tempo de nado e imobilidade. Este aparato é construído em forma cilíndrica e o animal permanece em seu interior, o qual é preenchido de água.....	74
Figura 29. Esquema dos quatro grupos experimentais, de acordo com os tratamentos recebidos: injeção intraperitoneal de salina e sedentarismo (CS), injeção intraperitoneal de salina e exercício (CE), injeção intraperitoneal de etanol e sedentarismo (ES) e injeção intraperitoneal de etanol e exercício (EE).....	77
Figura 30. Delineamento experimental 1: administração de etanol ou salina realizada de forma intraperitoneal. Foram realizados 4 ciclos sendo cada um deles composto de três dias consecutivos de injeção, seguidos de dois dias sem administração de substância	78
Figura 31. Avaliação do efeito do treinamento, na velocidade média, durante o protocolo de exercício físico na esteira.....	79
Figura 32. Avaliação da expressão gênica do CRF após os protocolos de intoxicação alcóolica por IP e exercício físico.....	80
Figura 33. Avaliação da expressão gênica do CRF-R1 após os protocolos de intoxicação alcóolica por IP e exercício físico.....	81
Figura 34. Avaliação da expressão gênica do CRF-BP após os protocolos de intoxicação alcóolica por IP e exercício físico.....	81
Figura 35. Esquema dos cinco grupos experimentais, de acordo com os tratamentos recebidos: Ar x ETOH (vapor) e sedentário x exercitado: controle vapor (CV), etanol sedentário (ES), etanol exercitado (EE), controle sedentário (CS) e controle exercitado (CE).....	83
Figura 36. Gráfico do consumo de etanol involuntário, habituação e no protocolo de IA2BC antes, durante e depois dos ciclos de vapor.	86
Figura 37. Gráfico do consumo de Água no IA2BC durante o protocolo de intoxicação à câmara de vapor.	88

Figura 38. Gráfico da preferência durante o protocolo de intoxicação à câmara de vapor..	89
Figura 39. Gráfico da velocidade média dos animais após o protocolo de exercício físico.	90
Figura 40. Gráfico do consumo de líquidos no IA2BC dos animais após o protocolo de exercício físico.....	91
Figura 41. (A). Imagem representativa da imunofluorescência. (B) Gráfico da quantificação do número de células da dupla marcação CA1-IBA/DAPI.	92
Figura 42. (A). Imagem representativa da imunofluorescência. (B) Gráfico da quantificação do número de células da dupla marcação CA1-GFAP/DAPI.	93
Figura 43. (A). Imagem representativa da imunofluorescência. (B) Gráfico da quantificação do número de células da dupla marcação CG-IBA/DAPI.	94
Figura 44. (A. Esquerda). Imagem representativa da imunofluorescência. (B. Direita) Gráfico da quantificação do número de células da dupla marcação CG-GFAP/DAPI.	95
Figura 45. Esquema dos oito grupos experimentais: (1) controle sedentário agrupado (CS); (2) controle exercitado agrupado (CEa), (3) etanol sedentário agrupado (ESa), (4) etanol exercitado agrupado (EEa), (5) controle sedentário isolado (CSi), (6) controle exercitado isolado (CEi), (7) etanol sedentário isolado (ESi), (8) etanol exercitado isolado (EEi).	96
Figura 46. Gráfico do consumo de etanol no IA2BC antes e depois dos ciclos de vapor.	101
Figura 47. Gráfico do consumo de água no IA2BC durante o protocolo de isolamento social.	103
Figura 48. Gráfico da preferência por etanol no IA2BC durante o protocolo de isolamento social.....	104
Figura 49. Gráfico da velocidade dos animais.....	105
Figura 50. Gráfico da frequência no tempo de permanência nos braços abertos	106
Figura 51. Gráfico da frequência de entrada nos braços abertos	107
Figura 52. Gráfico do número de entradas nos braços fechados	108
Figura 53. Gráfico da frequência do tempo de permanência na zona central.....	109
Figura 54. (A). Gráfico do tempo de exploração dos objetos na habituação.....	110
Figura 55. (A) Gráfico do tempo de exploração dos objetos no teste de 1hora.....	111
Figura 56. (A) Gráfico do tempo de exploração dos objetos no teste de 24hora.....	112
Figura 57. Gráfico do número de quedas no teste RotaRod.	114

Figura 58. (A) Gráfico do tempo de latência para iniciar o grooming.	115
Figura 59. (A) Gráfico do tempo de imobilidade no nado forçado.	118
Figura 60. (A) Imagem representativa das bandas de expressão das proteínas LC3-I, p62 e GAPDH. (B) Gráfico da expressão da proteína LC3-I nos diferentes grupos experimentais (isolado/ Agrupado. Etanol/controle e exercício/sedentário). (C) Gráfico da expressão da proteína p62 nos diferentes grupos experimentais (isolado/ Agrupado. Etanol/controle e exercício/sedentário).....	119
Figura 61. (A) Imagem representativa das bandas de expressão das proteínas p-mTOR e t-mTOR. (B) Gráfico da taxa de fosforilação da proteína mTORC1 nos diferentes grupos experimentais (isolado/ Agrupado. Etanol/controle e exercício/sedentário). (C) Gráfico da expressão da proteína t-mTORC1 nos diferentes grupos experimentais (isolado/ Agrupado. Etanol/controle e exercício/sedentário). (D) Gráfico da expressão da proteína p-mTORC1 nos diferentes grupos experimentais (isolado/ Agrupado./Etanol/controle e exercício/sedentário)..	121
Figura 62. (A) Imagem representativa das bandas de expressão das proteínas BDNF e GAPDH. (B) Gráfico da expressão da proteína BDNF	122
Figura 63. Avaliação do efeito do tratamento com etanol e salina, no peso dos animais, durante o protocolo de intoxicação alcóolica por IP.....	171
Figura 64. Avaliação do efeito do tratamento com etanol e salina, no peso dos animais, após os protocolos de intoxicação alcóolica por IP e exercício físico.	172
Figura 65. Gráfico do consumo de etanol no IA2BC durante o protocolo de consumo forçado (semana 1)	173
Figura 66. Gráfico do consumo de etanol no IA2BC durante a habituação ao IA2BC (semana 2). Nele pode-se observar que não existiu diferença no consumo entre os grupos de animais (vapor e ar).	173
Figura 67. Gráfico do consumo de água no IA2BC durante a habituação ao IA2BC (semana 2).....	174
Figura 68. Gráfico do peso dos animais durante o protocolo de intoxicação à câmara de vapor.	175
Figura 69. Gráfico do peso dos animais após o protocolo de exercício físico.....	176
Figura 70. Gráfico do peso dos animais agrupados (A) e isolados (B) ao longo de todo o experimento 3.	177
Figura 71. Gráfico do número de entradas no braço aberto.....	180
Figura 72. Gráfico do tempo total no braço aberto.....	181
Figura 73. Gráfico do tempo total no braço fechado.	182
Figura 74. Gráfico do tempo total no terço final do braço aberto	183

Figura 75. A. Gráfico do número de mergulhos desprotegidos.....	184
Figura 76. B. Gráfico do número de mergulhos protegidos	185
Figura 77. (A) Gráfico do número de esticadas desprotegidas.....	186
Figura 78. (B) Gráfico do número de esticadas protegidas	186
Figura 79. (A) Gráfico do tempo de permanência na zona central do CA. (B) Gráfico do tempo de permanência na zona periférica do CA	188
Figura 80. Gráfico da % tempo de exploração dos objetos na habituação.	189
Figura 81. Gráfico da % tempo de exploração dos objetos no teste de 1 hora	191
Figura 82. Gráfico da % tempo de exploração dos objetos no teste de 24 horas.....	192

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Alguns dos critérios de dependência de substâncias segundo a DSM-5.....	33
Tabela 2. Tabela da descrição dos parâmetros utilizados para as contagens das células da glia	66
Tabela 3. Representação do protocolo experimental ao longo das semanas. Nas linhas estão representadas as semanas, nas colunas estão representados os dias e no cruzamento, qual foi o tratamento.	84
Tabela 4. Valores sanguíneos da alcoolemia dos animais que passaram pelo protocolo de intoxicação ao etanol pela câmara de vapor e dos animais do grupo controle	85
Tabela 5. Representação do protocolo experimental ao longo das semanas. Nas linhas estão representadas as semanas, nas colunas estão representados os dias e no cruzamento, qual foi o tratamento.	99
Tabela 6. Valores sanguíneos da alcoolemia dos animais que passaram pelo protocolo de intoxicação ao etanol pela câmara de vapor e dos animais do grupo controle	100
Tabela 7. Imagem representativa dos nossos principais resultados	123

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%Pe- Preferência pelo etanol

%TE - porcentagem do tempo de exploração

4EBP- Proteína de ligação ao fator de iniciação eucariótica 4E (do inglês: *eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E) - binding protein*)

5-HT3- Hidroxitriptamina ou serotonina

ACTH- Hormônio Adrenocorticotrófico

Akt- Homólogo 1 do oncogene viral do timoma murino V (do inglês: *V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1*)

AMG- Amígdala

AMPA- Receptor α -amino-3-hidroxil-5-metil-4-isoxazol-propionato

AMPK- Proteína quinase ativada (sigla do inglês: *AMP- activated protein kinase*)

Atg13- Proteína relacionada a autofagia 13kD (*Autophagy-related 13kD*)

AUD- Transtornos associados ao uso do etanol

BDNF- Fator Neurotrópico Derivado do Cérebro

BEC- Concentração Sanguínea de Etanol

BNST - Núcleo da estria terminal

CA- Campo aberto

CA1- *Cornu Amonis*

CAzc - tempo (s) de permanência na zona central

CAzp- tempo (s) de permanência na zona periférica

CE- Controle Exercício

CeA - Amígdala central

CEDEME– UNIFESP - *Centro* de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia

CEUA/UNIFESP - Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Paulo

CID- Manual de Classificação Internacional de Doenças

CORT- glicocorticoides

CPF- Córtex Pré-Frontal

CRF- Fator Liberador de Corticotropina

CRFBP - proteína de ligação ao CRF

CRF-R1- Receptor 1 do hormônio CRF

CRF-R2 - Receptor 2 do hormônio CRF

CS- Controle Sedentário

CVE- Câmara de Vapor de Etanol

DG- Giro Denteado

DSM- Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (do inglês *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*),

EE- Etanol Exercitado

EF- Exercício físico

ES - Etanol Sedentário

ETOH- Etanol

FIOCRUZ- Fundação Oswaldo Cruz

FIP200 - Proteína Interagindo da Família Quinase de Adesão Focal de 200 kD (*Focal Adhesion Kinase Family Interacting Protein of 200 kD*).

G- Grooming

GABA- Ácido Gama-Aminobutírico

GEE - Equações de Estimação Generalizadas

GFAP - Proteína Ácida Fibrilar Glial (do inglês: *Glial Fibrillary Acidic Protein*)

Gs- Proteína G estimulatória

Gt- tempo total de limpeza (s) no grooming

HIP- Hipocampo

HPA- Eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal

IA2BC - Acesso Intermitente de livre escolha

IBA-1 - Molécula Adaptadora de ligação de cálcio ionizado 1 (inglês: *Ionized Calcium Binding Adaptor Molecule 1*)

IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IGF-1 - Fator de crescimento semelhante à insulina

IL- Interleucina

IP- Administração intraperitoneal de etanol (IPe) ou salina (IPs)

K⁺ - potássio

LC3- Proteína de cadeia leve 3 associada a microtúbulos (do inglês: *microtubule-associated protein light chain 3*)

LCE- Labirinto em cruz elevado

LCETba - Tempo total (s) nos Braços Abertos

LCETbf - Tempo total (s) nos braços fechados

LCETed - tempo total de esticadas desprotegidas

LCETep - tempo total de esticadas protegidas

LCETmd - tempo total de mergulhos desprotegidos

LCETmp- tempo total de mergulhos protegidos

LCETtf- tempo (s) no terço final

LNUD- Levantamento Nacional sobre o Uso de Drogas pela População Brasileira

LTP - Potenciação de longo prazo (do inglês: *long term potentiation*)

MC2-R - Receptores de melanocortina tipo 2

MTOR- Alvo Mamífero da Rapamicina

Na⁺ - Sódio

NAc- Núcleo Accumbens

NF- Nado forçado

NFi - Tempo (s) total de imobilidade no nado forçado

NFn- tempo (s) total de nado no nado forçado

NGF- Fator de crescimento nervoso

NMDA- Receptor Glutamatérgico N-metil-D-aspartato

NORT- Teste do Reconhecimento do Objeto Novo

OMS- Organização Mundial da Saúde

p62- Proteína SQSTM1/p62

p70S6K – Proteína p70S6 quinase

PI3K - Ffosfatidilinositol-3-quinase

PND- Dia Pós-Nascimento

pS6- Proteína ribossômica S6

PVN- Neurônios Parvocelulares do Núcleo Paraventricular

RR- RotaRod

RRlat - Latência (s) para a primeira queda no RotaRod

RRnq- Número total de quedas no RotaRod

RT-PCR- Transcriptase reversa seguida pela Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês: *Real Time Reverse transcription polymerase chain reaction*)

SNC- Sistema Nervoso Central

TCE- Traumatismo cranioencefálico

TEM - Teste de esforço máximo

Tipo-1 NSCs - células tronco neuronais tipo 1

Tipo-2a NPCs - células progenitoras neuronais tipo 2

TrK – Receptor de BDNF

ULK1- Enzima codificada pelo gene ULK-1 (sigla do inglês: *Unc-51-like kinase*)

UNODC- Escritório das Nações Unidas sobre Drogas e Crime (do inglês: *United Nations Office on Drugs and Crime*)

VEGF - Fator de crescimento endotelial vascular

VTA- Área Tegmental Ventral

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	24
1.1 HISTÓRIA DO ETANOL	24
1.2 DADOS EPIDEMIOLÓGICOS.....	25
1.3 A ADOLESCÊNCIA E O CONSUMO DE ETANOL.....	28
1.4 O ESTRESSE E O CONSUMO DE ETANOL	30
1.5 O DESENVOLVIMENTO DO TRANSTORNO POR ABUSO DE ETANOL(AUD).....	32
1.5.1 <i>Síndrome de Abstinência ao Etanol</i>	34
1.6 MECANISMOS DE AÇÃO DO ETANOL	35
1.7 USO CRÔNICO DO ETOH E SEUS EFEITOS A LONGO PRAZO.....	39
1.7.1 <i>Relação do Fator Liberador de Corticotrofina e a administração de Etanol</i>	40
1.7.2 <i>Relação das Células da Glia e da administração de Etanol</i>	43
1.7.3 <i>Relação entre Autofagia e administração de Etanol</i>	46
1.7.4 <i>Relação entre Neuroplasticidade e administração de ETOH</i>	51
1.8 TRATAMENTOS DA DEPENDÊNCIA ALCÓOLICA E DA SÍNDROME DE ABSTINÊNCIA.....	54
1.8.1 <i>Exercício físico sistematizado</i>	55
2. HIPÓTESE	56
3. OBJETIVOS.....	56
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:.....	57
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	57
4.1 ANIMAIS	57
4.2 SUBSTÂNCIAS	58
4.3 ESTEIRA DE EXERCÍCIO FÍSICO	58
4.4 O SISTEMA DA CÂMARA DE VAPOR DE ETANOL	59
4.5 PROTOCOLOS DE ISOLAMENTO SOCIAL:	60
4.6 ADMINISTRAÇÃO INTRAPERITONEAL DE ETANOL (IPE) OU SALINA (IPs).....	60
4.7 CONSUMO DE LÍQUIDOS NO MODELO: ACESSO INTERMITENTE DE LIVRE ESCOLHA (IA2BC)	60
4.8 INTOXICAÇÃO PELA EXPOSIÇÃO À CÂMARA DE VAPOR DE ETANOL	62
4.9 PROTOCOLO DE EXERCÍCIO FÍSICO DE INTENSIDADE MODERADA	63
4.10 ANÁLISE DE RT-PCR.....	64
4.11 IMUNOFLUORESCÊNCIA PARA CÉLULAS DA GLIA (MICRÓGLIA:IBA-1 E ASTRÓCITO: GFAP).....	65
4.12 WESTERN BLOTTING PARA LC3-I, p62, m-TOR (TOTAL E FOSFORILADA) E BDNF.....	66
4.13 LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO (LCE)	68
4.14 CAMPO ABERTO (CA).....	69
4.15 TESTE DO RECONHECIMENTO DO OBJETO NOVO (NORT)	70
4.16 SPLASH DE SACAROSE.....	72
4.17 ROTAROD (RR)	73
4.18 NADO FORÇADO (NF)	73
4.19 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	74
4.19.1 <i>Experimento 1:</i>	74
4.19.2 <i>Experimento 2:</i>	75
4.19.3 <i>Experimento 3:</i>	75

5. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E RESULTADOS	76
5.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL DO EXPERIMENTO 1:	77
5.2 RESULTADOS DO EXPERIMENTO 1:	78
5.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL DO EXPERIMENTO 2	82
5.4 RESULTADOS DO EXPERIMENTO 2:	85
5.5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL DO EXPERIMENTO 3:	95
5.6 RESULTADOS DO EXPERIMENTO 3:	99
6. DISCUSSÃO	123
6.1 EXPERIMENTO 1:	124
6.2 EXPERIMENTO 2:	127
6.3 EXPERIMENTO 3:	131
7. CONCLUSÃO	141
8. REFERÊNCIAS	142
ANEXO 1.....	170
MATERIAIS SUPLEMENTARES.....	171

1. INTRODUÇÃO

1.1 HISTÓRIA DO ETANOL

O consumo de substâncias psicoativas, como o etanol, é relatado pelas diferentes civilizações desde a antiguidade, sendo inicialmente o seu uso destinado e relacionado às festividades religiosas, rituais espirituais e práticas medicinais (ANDERSON; RAY, 1982; ROYCE; SCRATCHLEV, 1989). Relatos de aproximadamente 7.000 - 6.000 anos a.C., sobre a utilização de bebidas alcoólicas como vinhos e cervejas, foram encontrados em fragmentos de jarros de cerâmica na China, em papiros egípcios e em um painel na tumba de Nebamun, homem pertencente à elite da XVIII dinastia egípcia, retratado na **Figura 1** (MCGOVERN et al., 2017, 2004).

Figura 1. Egípcios na colheita de uvas para a produção de vinho. Painel na Tumba de Nebamun, da XVIII dinastia egípcia, na Necrópole de Tebas.



Fonte 1. Imagem retirada do The Yorck Project (2002). ISBN: 3936122202.

Os relatos sobre o uso medicinal de etanol foram encontrados em textos Suméricos, Egípcios e na bíblia hebraica e datam de aproximadamente 2100 anos a.C. Neles são encontradas recomendações para que pessoas que estão deprimidas ou morrendo consumam o etanol para que possam esquecer suas misérias (como em Provérbios 31:6–7).

Na idade média popularizou-se o processo de destilação do etanol, levando ao surgimento de bebidas como uísques na Escócia e Irlanda; aquavita na Escandinávia e ao gim na Grã-Bretanha. Durante o período das navegações e conquistas das Américas, o processo de destilação se difundiu e outras bebidas como rum, tequila e cachaça foram desenvolvidas (ANDERSON; RAY, 1982; ROYCE; SCRATCHLEV, 1989).

Durante a idade moderna, líderes religiosos como Martin Luther e John Calvin pregavam que o etanol era um presente divino e, como tal, tinha sido criado para ser consumido com moderação e para finalidade recreativa (CROSS; LIVINGSTONE, 2005). No início do século XVIII, apesar de episódios de embriaguez já terem sido relatados, como a “Embriaguez de Noé” (“*E bebeu do vinho, e embebedou-se; e descobriu-se no meio de sua tenda*”) (GÊNESIS 9.21) esses episódios ainda não eram estigmatizados.

Figura 2. Pintura feita pelo artista Giovanni Bellini (1430-1516) intitulada: Embriaguez de Noé (traduzido do inglês: Drunkenness of Noah).



Fonte 2. Disponível em www.parisdiarybylaure.com. Acesso em: 01/11/2023.

A partir do século XIX, com o crescente processo decorrente da revolução industrial e consequentes mudanças no padrão de vida dos trabalhadores, a embriaguez passou a ser vista como uma ameaça à eficiência na realização do trabalho e ao crescimento industrial (HANSON, 1995). Durante esse período, o uso excessivo de bebidas alcoólicas passou então a ser visto como uma doença ou desordem e, a partir do século XX, países como França e Estados Unidos estabeleceram a maioridade de 18 anos para o consumo de etanol e decretam a Lei Seca, em 1920, respectivamente (BRADBURY, 1995).

Em 1952, com a primeira edição do Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM; traduzido originalmente do inglês *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*), o “alcoolismo” passou a ser tratado como doença (JAFFE, 1993).

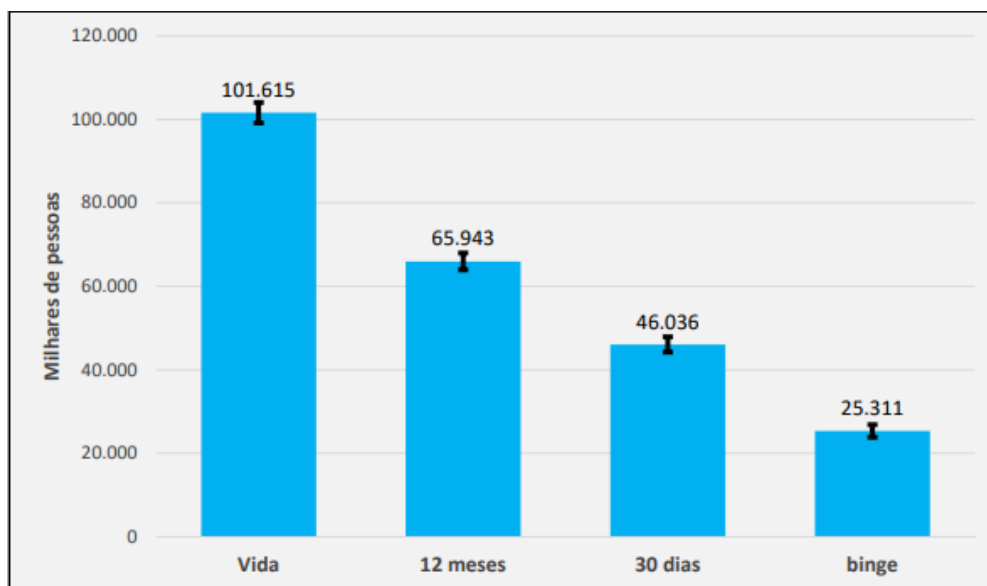
1.2 DADOS EPIDEMIOLÓGICOS

Atualmente, o uso de drogas de abuso é considerado como um grande problema de saúde pública mundial, pois as consequências negativas decorrentes desse uso geram altos custos sociais e econômicos (OPAS/OMS, 2019). O relatório elaborado pelo Escritório das Nações Unidas sobre Drogas e Crime (do inglês: *United Nations Office on Drugs and Crime-UNODC*), no ano 2021, mostrou que 5,5% da população mundial, ou seja, 275 milhões de pessoas, entre 15-64 anos, já utilizaram algum tipo de droga, seja lícita ou ilícita (UNODC, 2021).

Entre as drogas lícitas, o etanol (ETOH) é a substância de abuso mais consumida no mundo, sendo que 12% da população faz seu uso diário e 2,6% preenchem o critério para transtorno por uso dessa substância (OPAS/OMS, 2019). Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), 3,3 milhões de mortes anuais são decorrentes dos transtornos causados pelo uso do etanol, o que representa 5,3% do total das mortes mundiais (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018) e, aproximadamente 200 doenças como câncer hepático, cirrose, transtornos psiquiátricos, entre outras, são correlacionados ao consumo dessa substância (OSAIN; ALEKSEEVIC, 2010).

De acordo com o III Levantamento Nacional sobre o Uso de Drogas pela População Brasileira (LNUD), realizado pela FIOCRUZ (Fundação Oswaldo Cruz), em 2017, aproximadamente 101,6 milhões de pessoas, ou seja, 66,4% da população entre 12-65 anos fez o uso de bebidas alcóolicas pelo menos uma vez na vida, sendo que 25.311 milhões fizeram o uso de etanol em um consumo do tipo binge, definido como um padrão de consumo no qual quatro ou cinco doses de bebidas alcóolicas são ingeridas em um período de 2 horas. No Brasil uma dose representa 14g de etanol puro o que corresponde a 350 ml de cerveja (5% de álcool), 150ml de vinho (12% de álcool) ou 45ml de destilado (como vodka, cachaça e tequila, com aproximadamente 40% de álcool) (CARBIA et al., 2018; COURTNEY; POLICH, 2009; MOTA et al., 2013). O gráfico da FIOCRUZ encontra-se na **figura 3** abaixo.

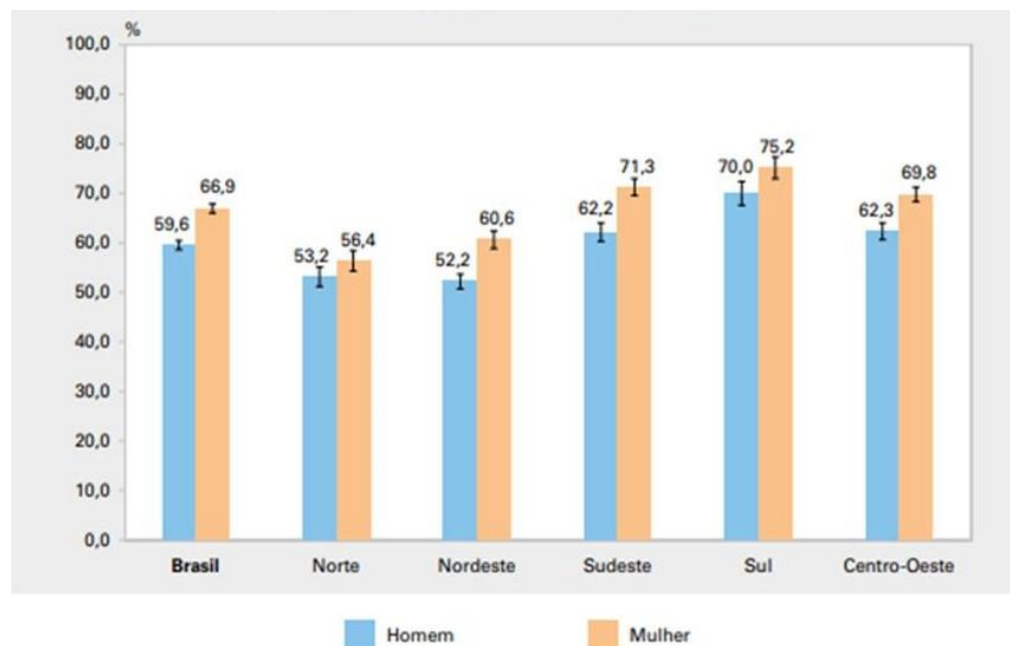
Figura 3. Número de pessoas (x 1000) de 12 a 65 anos que consumiram bebidas alcoólicas no Brasil. As barras representam o número de pessoas que fizeram o uso durante a vida, nos últimos 12 meses, nos últimos 30 dias e consumo tipo binge.



Fonte 3. ICICT, Fiocruz. III Levantamento Nacional sobre o Uso de Drogas pela População Brasileira, 2017.

Além disso, nesse mesmo levantamento, observou-se que durante os 12 meses anteriores à pesquisa, aproximadamente 2,3 milhões de indivíduos entre 12-65 anos preencheram os critérios do DSM-IV (versão publicada na época) para o transtorno por uso de substâncias, sendo importante ressaltar que 119 mil desses dependentes eram adolescentes entre 12-17 anos de idade (BASTOS, 2017). De acordo com uma pesquisa realizada pelo IBGE, em 2019, representada pela **figura 4** abaixo, mais da metade da população brasileira em idade escolar (entre 13 e 17 anos) já fizeram o uso de etanol pelo menos uma vez na vida (CISA, 2022; GUEDES, 2019).

Figura 4. Gráfico do Percentual de escolares de 13 a 17 anos que experimentaram bebida alcoólica alguma vez na vida (IC= 95%), por sexo, segundo as Grandes regiões- 2019.



Fonte 4. IBGE, Diretoria de Pesquisa, Coordenação de População e Indicadores Sociais, Pesquisa Nacional de Saúde do Escolar, 2019.

Vários fatores impactam e determinam os diferentes padrões de consumo de etanol, como por exemplo, a religião, a situação econômica, o sexo, o ambiente/qualidade de vida (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018), os fatores estressantes aos quais os indivíduos são expostos (PUCCI et al., 2019a) e a idade na qual iniciam o uso dessa substância (PAUTASSI et al., 2008a). Entretanto, a alta razão entre a prevalência de transtornos associados ao uso do etanol na adolescência (AUD; sigla traduzida do termo em inglês: *Alcohol Use Disorder*) entre indivíduos que consumiram etanol e a prevalência desses transtornos na população geral, indica uma maior chance de dependência entre os indivíduos que iniciaram o consumo de etanol mais precocemente (BASTOS, 2017).

1.3 A ADOLESCÊNCIA E O CONSUMO DE ETANOL

A adolescência é uma fase crítica do desenvolvimento, a qual envolve mudanças físicas, cognitivas, emocionais, sociais e comportamentais significativas (KOOB; VOLKOW, 2016a). Essa fase é caracterizada por um estágio de maturação cerebral em que ocorrem remodelações nos circuitos neurais, como a superprodução de axônios e sinapses, seguida por uma rápida poda dendrítica visando eliminar conexões sinápticas desnecessárias, incluindo regiões como

o córtex pré-frontal (CPF) (ANDERSEN, TEICHER, 2004), Núcleo Accumbens (NAc) (TEICHER; ANDERSEN; HOSTETTER, 1995) e Amígdala (AMG) (ZEHR; TODD; SCHULZ; MCCARTHY, 2006).

Durante o período da adolescência, as remodelações nas regiões límbicas, especificamente o NAc, o Hipocampo (HIP) e o CPF se desenvolvem em tempos diferentes e de forma não-linear, sendo que a maturação das regiões pré-frontais ocorre posteriormente à maturação do NAc (AHMED; BITTENCOURT-HEWITT; SEBASTIAN, 2015; CASEY; JONES; HARE, 2008). Essa diferença de maturação entre NAc, responsável pela busca de novidades, e do CPF, responsável pelo controle nos impulsos, faz com que os adolescentes sejam mais propensos aos comportamentos de risco (CASEY; GETZ; GALVAN, 2008; THOMA et al., 2011). A diferença de maturação entre HIP e CPF, responsáveis pelo processo de aprendizado e memória, tornam os adolescentes mais vulneráveis às ações do etanol (CASEY; GETZ; GALVAN, 2008; THOMA et al., 2011). Essas mudanças nos circuitos neurais estão associadas com as modificações funcionais cognitivas e com as características comportamentais específicas à idade, as quais fornecem uma base biológica para predispor os adolescentes a iniciarem o uso de etanol ou outras drogas e os tornam mais vulneráveis aos seus efeitos (KOOB; VOLKOW, 2016a; MONTESINOS et al., 2018; SPEAR, 2000).

Além da imaturidade neuronal, os adolescentes apresentam padrões de uso de etanol diferentes dos adultos (LEES et al., 2020). Embora os adolescentes consumam essa substância com menos frequência, geralmente o consumo é feito em quantidades maiores de ETOH do que os adultos (SAHMSA, 2022; SEEMILLER; GOULD, 2020) seguindo o padrão de consumo do tipo *binge*, como demonstrado pelo gráfico do LNUD e definido anteriormente, no item 1.2 (CARBIA et al., 2018; COURTNEY; POLICH, 2009; MOTA et al., 2013). Por exemplo, utilizando um modelo animal de consumo, Holstein et. al (2011) verificaram que camundongos C57BL/6J adolescentes apresentaram aumento significativo na ingestão de etanol, atingiram maior concentração sanguínea de etanol (BEC; sigla derivada do termo em inglês: *Blood Ethanol Concentration*) e aumentaram o consumo dessa substância ao longo dos sucessivos ciclos do consumo tipo “binge” comparados aos camundongos adultos (HOLSTEIN; SPANOS; HODGE, 2011).

O consumo excessivo e a intoxicação precoce de ETOH, estado transitório que ocorre quando há ingestão excessiva de bebida alcoólica e concentrações elevadas dessa substância no sangue, também são alguns dos fortes preditores para o aparecimento tardio de transtornos relacionados ao uso dessa substância (DEWIT et al., 2000). Vera et al. (2019) demonstraram em um estudo clínico que o marco preditivo mais importante para o uso subsequente e

problemático do etanol encontra-se no primeiro episódio de intoxicação ou embriaguez ao qual o consumidor é exposto. Neste trabalho foi observado maior número de consequências negativas relacionadas o seu uso, após um início precoce do consumo, apenas nos participantes que já haviam experimentado um episódio de intoxicação ou embriaguez na adolescência. Outro estudo realizado por Kuntsche et al. (2017) mostrou que a embriaguez precoce, mas não o consumo precoce de etanol, gerou vários comportamentos problemáticos em adolescentes. Da mesma forma, Alaux-Cantin et al (2013), em um estudo realizado com ratos intoxicados com etanol durante a primeira adolescência, demonstraram que esses animais aumentaram o consumo voluntário de livre escolha e aumentaram a motivação na autoadministração de etanol quando comparados aos animais intoxicados na fase juvenil.

Os dados relatados acima, juntamente com a alta prevalência do consumo excessivo de ETOH em adolescentes, sugerem que os modelos utilizados para compreender os efeitos do consumo dessa substância sobre o neurodesenvolvimento devem promover condições semelhantes à embriaguez. Para isso, se preconiza o uso de modelos que induzam níveis altos de consumo de etanol em um curto espaço de tempo, compatível com a definição de “*binge drinking*” ou intoxicação (SALGUERO et al., 2020).

1.4 O ESTRESSE E O CONSUMO DE ETANOL

Estudos em humanos e animais revelaram que o período da adolescência está associado a aumento na reatividade ao estresse e que a exposição aos fatores estressantes ao longo dessa fase pode causar plasticidades duradouras que podem modular de forma diferenciada as respostas desses indivíduos ao estresse na vida adulta (ROMEO, 2013; SPEAR, 2015).

O estresse tem sido definido como um estímulo que altere a homeostase do organismo (YARIBEYGI et al., 2017) e que produza uma reação dinâmica destinada a restaurar o equilíbrio dos sistemas biológicos (KOOB et al., 1989; YARIBEYGI et al., 2017). Entre os modelos de estresse crônico, um dos mais utilizados é o estresse crônico imprevisível (MOGRABI et al., 2020; MONTEIRO et al., 2015; SEQUEIRA-CORDERO et al., 2019), no qual os animais são expostos a diferentes estressores como, por exemplo, choque nas patas, restrição alimentar, contenção física, separação materna e isolamento social, durante um período de 3-4 semanas (PUCCI et al., 2019b).

O isolamento social pode ser um estressor na adolescência e os seus efeitos são geralmente mais pronunciados quando esse ocorre no início da adolescência (SPEAR, 2015).

Lukkes et. al (2009) investigaram os efeitos do isolamento social no início da vida relacionado ao comportamento de medo e tipo ansioso em ratos machos adultos. Quando submetidos ao teste decampo aberto para avaliar o comportamento tipo ansioso, esses animais exibiram aumento no comportamento semelhante à ansiedade e ao medo quando comparados aos animais mantidos em convívio social (LUKKES et al., 2009).

Também tem sido demonstrado que a cronicidade do isolamento social parece aumentar a ingestão de etanol (CACIOPPO et al., 2011; ZORZO et al., 2019), como observado no estudo feito por Wukitsch et. al (2018), no qual ratos adolescentes mantidos em isolamento social tiveram aumento tanto na preferência por etanol quanto no seu consumo quando comparado aos animais que permaneceram em convívio social. Corroborando a esses achados, Evans et al (2020) observaram aumento no comportamento semelhante à ansiedade, assim como aumento de 20-30% no consumo de ETOH por camundongos machos C57BL/6J que foram mantidos em isolamento.

Além dos efeitos do estresse na modulação do consumo de ETOH, estudos também relatam que a própria exposição ao etanol pode ser um fator estressor por si só (PUCCI et al., 2019b). O transtorno por uso de etanol (AUD) tem sido associado às alterações mal adaptativas persistentes do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), levando a respostas alteradas ao estresse e ao aumento da suscetibilidade a emoções negativas induzidas pelo estresse (KOOB; LE MOAL, 2008; LE MOAL, 2009). Estudos mostraram que a exposição crônica intermitente de camundongos ou ratos à câmara de vapor de etanol (CVE) aumentou o comportamento tipo ansioso, a sensibilidade ao estresse (BALDWIN et al., 1991; SIDHU; KREIFELDT; CONTET, 2018a; VALDEZ et al., 2003), além de alterar a função sináptica e a excitabilidade neuronal no CPF e amígdala estendida (GILPIN, 2012; MARTY et al., 2020a).

Esses resultados corroboram a relação bidirecional entre estresse e etanol: o ETOH altera as respostas ao estresse e, por sua vez, o estresse modifica a percepção dos efeitos subjetivos da droga (ANDERSON et al., 2019; VARLINSKAYA; SPEAR; DIAZ, 2018; VARLINSKAYA; TRUXELL; SPEAR, 2014) e, tanto os ciclos de intoxicação a essa substância durante o período inicial da adolescência, quanto o estresse do isolamento social durante esse período tem sido associado ao uso mais crônico e intensivo, assim como a um padrão de consumo abusivo de etanol na vida adulta (ANDERSON et al., 2019; VARLINSKAYA; SPEAR; DIAZ, 2018; VARLINSKAYA; TRUXELL; SPEAR, 2014).

Visto que a relação de causa e consequência entre “adolescência-estresse-etanol” ainda não seja bem compreendida, estudos sobre os mecanismos moleculares e as modificações

comportamentais ocasionados por essa interação tem sido fundamentais para a compreensão dos problemas associados ao abuso dessa substância (BROWN et al., 2000; MOORE et al., 2010; PAUTASSI et al., 2008b).

1.5 O DESENVOLVIMENTO DO TRANSTORNO POR ABUSO DE ETANOL (AUD)

A exposição crônica ao etanol está relacionada a um hábito comum da sociedade, que pode causar impactos negativos sobre a mesma, devido entre outras coisas, ao aumento de comportamentos agressivos que podem repercutir em violência, aos desentendimentos familiares e ao fracasso profissional (CAMPANA et al., 2012). Embora seja lícito e intensamente consumido pelas sociedades, o etanol tem a capacidade de agir no encéfalo e modificar o seu funcionamento provocando alterações no humor, percepção e comportamento (OMS, 2020), sendo considerado como uma droga de abuso, podendo levar o indivíduo à dependência (BASTOS et al., 2017; GIANCOLA, 2012).

De acordo com a décima edição do Manual de Classificação Internacional de Doenças (CID-10), o consumo de uma droga de abuso pode ser classificado em três diferentes padrões: o uso ocasional, o uso abusivo e o uso dependente (HARRISON et al., 2021). O uso ocasional é aquele que não interfere nas atividades habituais e não é feito de forma compulsiva; o uso abusivo refere-se a um padrão mal adaptado de consumo e acarreta algumas consequências adversas para o indivíduo; a dependência, por sua vez, é evidenciada pela perda total de controle do indivíduo diante do consumo da substância (ONU, 2022).

Segundo a 5ª edição do DSM-5, o padrão de uso abusivo e a dependência foram reunidos em uma nova terminologia e passaram a ser chamados de “Transtornos por Uso de Substâncias” (SARMIENTO; LAU, 2020). Também foram definidos alguns critérios para auxiliar no diagnóstico de um indivíduo com AUD, os quais avaliam o conjunto de sintomas comportamentais e fisiológicos persistentes observados por mais de 12 meses ao longo do uso crônico da droga. De acordo com o número de critérios preenchidos, o paciente é classificado como portador de transtorno leve (1-3 critérios), moderado (4-5 critérios) ou grave (6 ou mais critérios) (SARMIENTO; LAU, 2020). Alguns destes critérios estão demonstrados na **Tabela 1** abaixo.

Tabela 1. Alguns dos critérios de dependência de substâncias segundo a DSM-5

1	A substância é frequentemente consumida em maiores quantidades ou por um período mais longo do que o pretendido
2	Existe um desejo persistente ou esforços malsucedidos no sentido de reduzir ou controlar o uso da substância
3	Muito tempo é gasto em atividades necessárias para a obtenção da substância, na utilização da droga ou na recuperação de seus efeitos
5	Uso recorrente da substância, resultando no fracasso em desempenhar papéis importantes no trabalho, na escola ou em casa
6	Uso continuado da substância, apesar de problemas sociais ou interpessoais persistentes ou recorrentes causados ou exacerbados por seus efeitos
7	Importantes atividades sociais, profissionais ou recreacionais são abandonadas ou reduzida em virtude do uso da substância
8	Uso recorrente da substância em situações nas quais isso representa perigo para a integridade física
9	O uso da substância é mantido apesar da consciência de ter um problema físico ou psicológico persistente ou recorrente que tende a ser causado ou exacerbado pela droga
10	Tolerância: necessidade de quantidades progressivamente maiores da substância para alcançar a intoxicação ou o efeito desejado
11	Síndrome de abstinência

Fonte 5. Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais (DSM-5), 5ªed., 2013.

Entende-se a partir desse ponto que a dependência, referindo-se ao transtorno por uso de substâncias na sua forma mais grave, será definida como um transtorno cronicamente recorrente, caracterizado pela compulsão em procurar e em consumir a droga a despeito das consequências negativas decorrentes do seu uso (KOOB; VOLKOW, 2016b).

Dessa forma, o transtorno por uso de substâncias, como o etanol, pode ser caracterizado por um conjunto de sinais e sintomas fisiológicos, comportamentais e cognitivos que se desenvolvem após o consumo repetido de uma droga de abuso, os quais incluem: dificuldades em controlar o uso, persistência do consumo apesar das consequências adversas, maior prioridade dada ao uso da droga do que a outras atividades cotidianas ou obrigações e

síndrome de abstinência (KOOB; VOLKOW, 2016b).

A síndrome de abstinência pode desencadear diversos sintomas negativos no indivíduo que o leva a buscar e consumir novamente a droga, representando um dos maiores desafios do tratamento da dependência (BECKER, 2014).

1.5.1 Síndrome de Abstinência ao Etanol

A síndrome de abstinência é definida como um conjunto de reações orgânicas, físicas e psíquicas que surgem quando o acesso à droga é interrompido bruscamente (MASHAL KHAN, 2022). Em relação à abstinência ao etanol, pode ser identificado o surgimento de estados emocionais negativos, como por exemplo, disforia, ansiedade e irritabilidade. Esses estados emocionais negativos exercem grande significado motivacional para a manutenção da dependência de drogas (GAWIN; KLEBER, 1986; KOOB; LE MOAL, 2001).

A persistência dos sintomas emocionais negativos além de levar os indivíduos a buscarem e consumirem novamente a substância de abuso, fato conhecido como recaída (BECKER, 2014), também favorecem a escalada do consumo da substância para quantidades maiores que as anteriores (BECKER; MULHOLLAND, 2014).

Clinicamente as características da síndrome de abstinência podem ser divididas em três fases distintas, de acordo com o tempo: abstinência aguda, abstinência inicial e abstinência protraída (HEILIG et al., 2010a).

A abstinência aguda pode surgir entre 48-72 horas em humanos e 24-48 horas em animais e é caracterizada por hiperexcitabilidade generalizada do sistema nervoso central, no qual os tremores e *delirium tremens* são evidentes e em alguns casos pode ocorrer convulsões (MAYO-SMITH, 1997). O *delirium tremens* é uma forma grave da síndrome de abstinência alcoólica, identificada como quadros de confusão mental, alucinações visuais, arritmias cardíacas e acomete em torno da metade dos pacientes, sendo ocasionado em decorrência do desequilíbrio de liberação dos neurotransmissores GABA e glutamato (BRAMNESS et al., 2022; GROVER; GHOSH, 2018).

A abstinência inicial se refere a um período intermediário que pode variar de 3-6 semanas em humanos e de 1-2 semanas em animais e nela observa-se a diminuição da presença dos sintomas físicos e o surgimento de sintomas de ansiedade, irritabilidade e distúrbios do sono (HEILIG et al., 2010a; SCHUCKIT; HESSELBROCK, 1994).

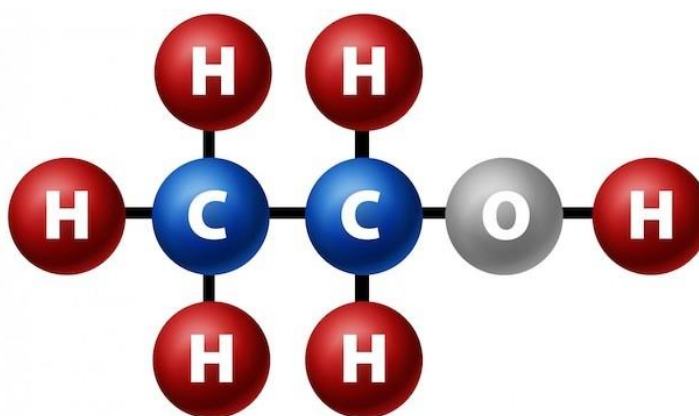
A abstinência protraída ocorre a partir de 3 meses em humanos e 1 mês em animais,

durante essa fase, observa-se aumento do afeto negativo (HEILIG et al., 2010a; SINHA; LI, 2007). Estudos sugerem que o surgimento de emoções negativas, durante esta fase de abstinência, esteja associado ao desejo por consumir novamente a substância, levando o indivíduo à recaída (MARTINOTTI et al., 2008).

1.6 MECANISMOS DE AÇÃO DO ETANOL

O ETOH, representado na **figura 5**, é uma molécula relativamente simples (POHORECKY; BRICK, 1988), é absorvido pelas mucosas gástricas e intestinais (90%) e apresenta rápida difusão pelos compartimentos intra e extracelulares do organismo (ROGERS; HARRIS; JARMUSKEWICZ, 1987). Uma vez na circulação, essa substância atravessa facilmente a barreira hematoencefálica atingindo o Sistema Nervoso Central (SNC) (DIAMOND; MESSING, 1994).

Figura 5. Ilustração da estrutura química da molécula de etanol. Entende-se por "C": carbono; "O": oxigênio e "H": hidrogênio.



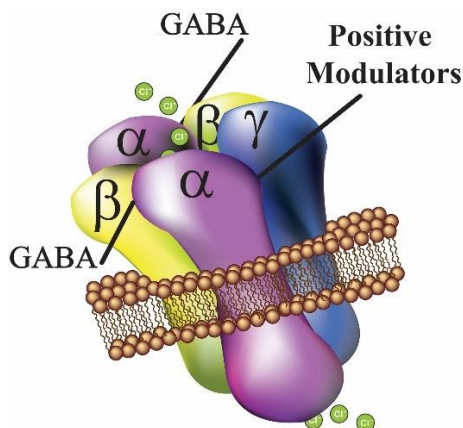
Fonte 6. Disponível em: https://www.freepik.es/vector-premium/diagrama-molecula-etanol_2440319.htm. Acesso feito: 01/11/2023

Essa substância é considerada depressora do sistema nervoso central e uma das suas ações principais é potencializar ação da neurotransmissão do ácido-gama-aminobutírico (GABA) e inibir a ação do neurotransmissor glutamato (ABRAHAO; SALINAS; LOVINGER, 2017).

O ETOH pode promover aumento da afinidade do GABA pelos receptores GABA-A, atuando como modulador alostérico positivo desse receptor (como representado na **Figura 6**) (ABRAHAO; SALINAS; LOVINGER, 2017). O receptor GABA_A é um canal iônico

dependente de ligante, constituído por 5 subunidades (α , β e γ) proteicas, ligadas de maneira a formarem um canal que controla o influxo de íons cloreto nos neurônios (ENNA, 1981; LOVINGER; ROBERTO, 2011, 2023).

Figura 6. Figura representativa do receptor GABA_A. O ETOH se liga na subunidade alfa, indicado na imagem como Positive Modulators. Em verde encontram-se representados os íons cloreto.

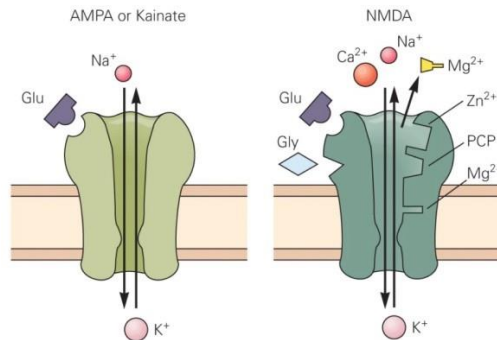


Fonte 7. Pantherics/Science. Disponível em: [Pantherics, Inc. • Science](#). Acesso feito: 01/11/2023.

O ETOH também age como modulador alostérico positivo nos receptores de glicina, os quais são responsáveis por mediar a inibição primária no tronco cerebral, medula espinhal e de outras estruturas do encéfalo. O receptor de glicina é constituído por cinco subunidades proteicas que formam um único canal de cloreto e o ETOH aumenta a resposta inibitória mediadas por esses canais (PERKINS et al., 2010).

Os receptores glutamatérgicos NMDA (N-metil-D-aspartato), AMPA (α -amino-3-hidroxil-5-metil-4-isoxazol-propionato), ilustrados na **figura 7**, e o receptor kainato são receptores iônicos não seletivos que permitem a passagem de sódio (Na^+) e/ou Cálcio (Ca^{+2}) e estão envolvidos na transmissão glutamatérgica excitatória (KAWAI, 1994). Apesar do mecanismo de ação do etanol nesses receptores ainda estar em discussão, acredita-se que agudamente o ETOH age bloqueando a ativação desses receptores, diminuindo o número de disparos neuronais excitatórios e, conseqüentemente, diminuindo a excitabilidade neuronal (LOVINGER; ROBERTO, 2011, 2023). Também acredita-se que essa substância pode promover aumento da fosforilação desses receptores, promovendo dessensibilização dos mesmos (CREWS et al., 1996).

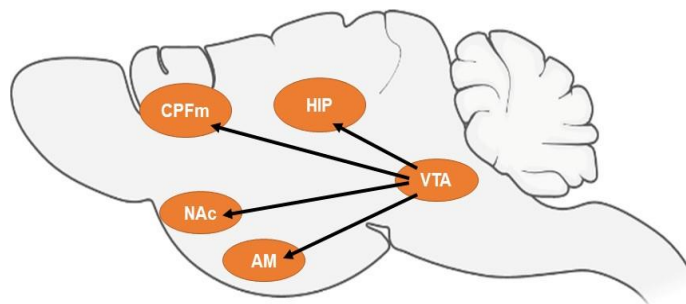
Figura 7. Figura representativa dos receptores glutamatérgicos AMPA/kainato (verde claro) e NMDA (verde escuro).



Fonte 8. Retirada do estudo realizado por (YATES, 2019).

Assim como outras substâncias de abuso (por exemplo, cocaína, heroína, nicotina, etc.), os efeitos reforçadores promovidos pelo ETOH também podem resultar de sua ação no sistema dopaminérgico mesocorticolímbico (KOOB; LE MOAL, 2008), o qual é formado por projeções de neurônios dopaminérgicos que vão da área tegmental ventral (VTA) para o córtex pré-frontal, núcleo accumbens, amígdala, hipocampo e outras estruturas do sistema límbico (LEWIS et al., 2021), representado pela **figura 8**. Esse sistema, em sua essência, é o responsável pela saliência motivacional, aprendizagem associativa, motivação e recompensa (BENINGER; MILLER, 1998; LEWIS et al., 2021; ROBBINS; EVERITT, 1996). Quando estímulos recompensadores são experimentados pelos indivíduos, esse sistema é ativado e a dopamina é liberada no NAc, sendo esse mecanismo associado aos efeitos eufóricos e a sensação subjetiva de prazer (CAMERON; WIGHTMAN; CARELLI, 2014; SMALL; JONES-GOTMAN; DAGHER, 2003).

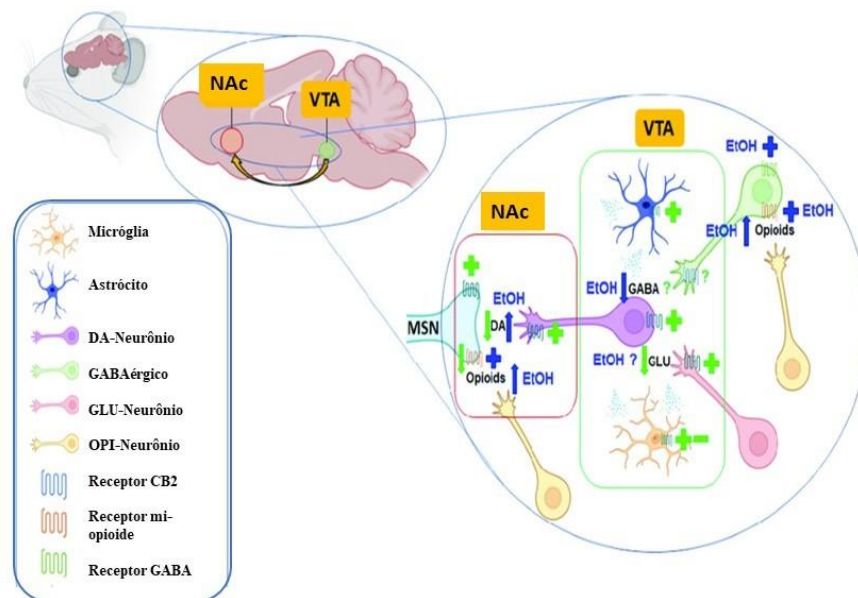
Figura 8. Representação esquemática da via mesocorticolímbica do encéfalo de roedores. As setas em preto indicam as vias dopaminérgicas que saem da Área tegmental ventral (VTA) para o Núcleo accumbens (NAc), Amígdala (Amg), Hipocampo (HIP) e Córtex pré-frontal (CPF).



Fonte 9. Imagem elaborada no programa de ilustração Biorender®.

Um dos mecanismos pelo qual o ETOH pode aumentar a ativação de neurônios dopaminérgicos ocorre através da inibição de receptores NMDA, localizados no corpo celular dos interneurônios GABAérgicos; outro mecanismo pode ocorrer através da liberação de peptídeos opioides na VTA, os quais inibem os interneurônios GABAérgicos dessa região, reduzindo a inibição dos neurônios dopaminérgicos e, como consequência, aumentam a liberação de dopamina no NAc, representado na **figura 9** (GILPIN, 2008; KOOB; VOLKOW, 2010; ABRAHAO; SALINAS; LOVINGER, 2017; GARCÍA-GUTIÉRREZ et al., 2022).

Figura 9. Ações do ETOH na VTA e no NAc. O etanol aumenta a liberação de dopamina no núcleo accumbens, principalmente por aumentar a liberação de opioides endógenos que atuam nos receptores mu-opioides e inibem a neurotransmissão gabaérgica.



Fonte 10. Imagem adaptada de (GARCÍA-GUTIÉRREZ et al., 2022).

Durante a abstinência do uso crônico de etanol ocorre queda na atividade dopaminérgica na VTA e redução dos níveis basais de dopamina nas regiões ventral e dorsal do corpo estriado (BAILEY et al., 2001; DIANA, 2011). Esse estado hipofuncional da dopamina está relacionado, em parte, ao afeto negativo e à disforia associada à abstinência protraída (DIANA, 2011).

Além desses já citados, o ETOH também modula diversos outros sistemas, como por exemplo, sistema serotoninérgico [-aumentando a atividade excitatória de alguns dos

receptores, como 5-HT₃ (5- hidroxitriptamina ou serotonina)] (LOVINGER, 1997); sistema endocanabinoide (KUNOS, 2020) e sistema colinérgico (HAWKINS et al., 2015), além de interagir com canais de cálcio voltagem dependentes (ABRAHAO; SALINAS; LOVINGER, 2017) e ativar indiretamente o sistema CRFérgico hipotalâmico e extra-hipotalâmico (LI et al., 2005). Os efeitos do ETOH nesses sistemas e receptores são dose-específicos e dependem de cada região.

1.7 USO CRÔNICO DO ETOH E SEUS EFEITOS A LONGO PRAZO

Cronicamente, o etanol induz alterações nos sistemas de neurotransmissores e neuropeptídeos relacionados ao estresse crônico, como a dinorfina e o fator liberador de corticotropina (CRF) (BECKER, 2017b), promove a ativação da sinalização neuroimune (ANAND et al., 2023) e alterações neuroplásticas (PEREGUD et al., 2023a), além de modular vias de apoptose e autofagia através da indução do estresse oxidativo e da modulação da cascata de complexos de proteínas como o alvo mamífero da rapamicina (mTOR) (derivada do inglês: *mammalian-target of rapamycin*) (LUO, 2014a).

Estudos realizados *in vivo* demonstraram que o uso crônico do etanol reduziu a neurogênese e aumentou a morte celular em animais adolescentes (MACHT et al., 2023). Além disso, foi observado que altas doses dessa substância suprimiram a neurogênese, na zona subgranular do giro denteado (DG) no hipocampo, de ratos jovens através da diminuição do número de células tronco neuronais tipo 1 (tipo-1 NSCs) e células progenitoras neuronais tipo 2 (tipo-2a NPCs), além de reduzir a plasticidade sináptica (TAKAHASHI et al., 2022).

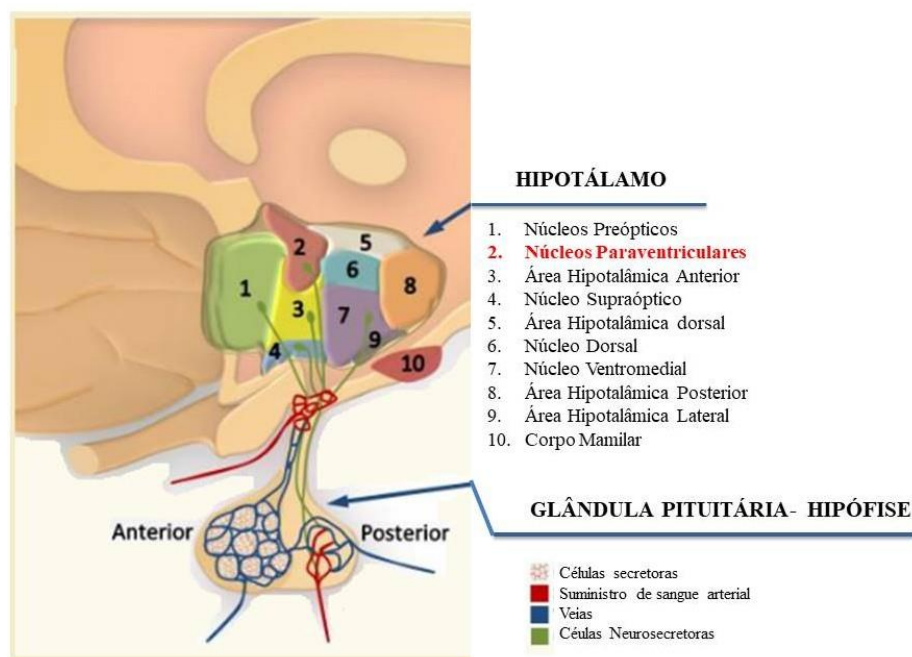
Outros estudos demonstraram forte correlação entre o uso crônico de etanol, durante a adolescência, e a diminuição da expressão do fator neurotrópico derivado do cérebro (BDNF), o qual é responsável pela sobrevivência e diferenciação de novos neurônios, o que culminou em déficits cognitivos tanto em humanos quanto em animais (CUTULI; SAMPEDRO-PIQUERO, 2022; PEREGUD et al., 2023b; SILVA-PEÑA et al., 2019). Luo (2014) demonstrou em seu estudo *in vitro* que, apesar dos danos mitocondriais causados pelo etanol resultarem na produção intracelular de espécies reativas de oxigênio e aumentarem o fluxo autofágico em resposta à neurotoxicidade do etanol como um mecanismo protetor, o uso crônico do etanol e a ativação da mTOR podem comprometer a via autofágica-lisossômica no cérebro (LUO, 2014a).

Essas evidências, em conjunto, podem levar às alterações e disfunções cerebrais como o comprometimento cognitivo e a neurodegeneração que perdurarão por toda a vida adulta do indivíduo e/ou animal (MOST; FERGUSON; HARRIS, 2014). As possíveis relações entre uso crônico do etanol durante a adolescência e alterações nesses sistemas ocorridas na abstinência protraída serão alvos deste estudo e melhores discutidos abaixo.

1.7.1 Relação do Fator Liberador de Corticotrofina e a administração de Etanol

O sistema CRFérgico, apesar de apresentar maior densidade das células sintetizadoras de CRF principalmente nas regiões do hipotálamo, nos neurônios parvocelulares do núcleo paraventricular (PVN), representado na **figura 10** (BACKSTRÖM; WINBERG, 2013; BLOOM et al., 1982), da amígdala extendida, particularmente na amígdala central (CeA) e no núcleo intersticial da estria terminal (BNST), também apresenta uma ampla expressão em outras regiões do encéfalo como locus coeruleus, córtex e hipocampo (SCHREIBER; GILPIN, 2018a).

Figura 10. Imagem ilustrativa do hipotálamo do encéfalo de humano. Em destaque (em vermelho), os núcleos paraventriculares, região com maior concentração de neurônios parvocelulares.



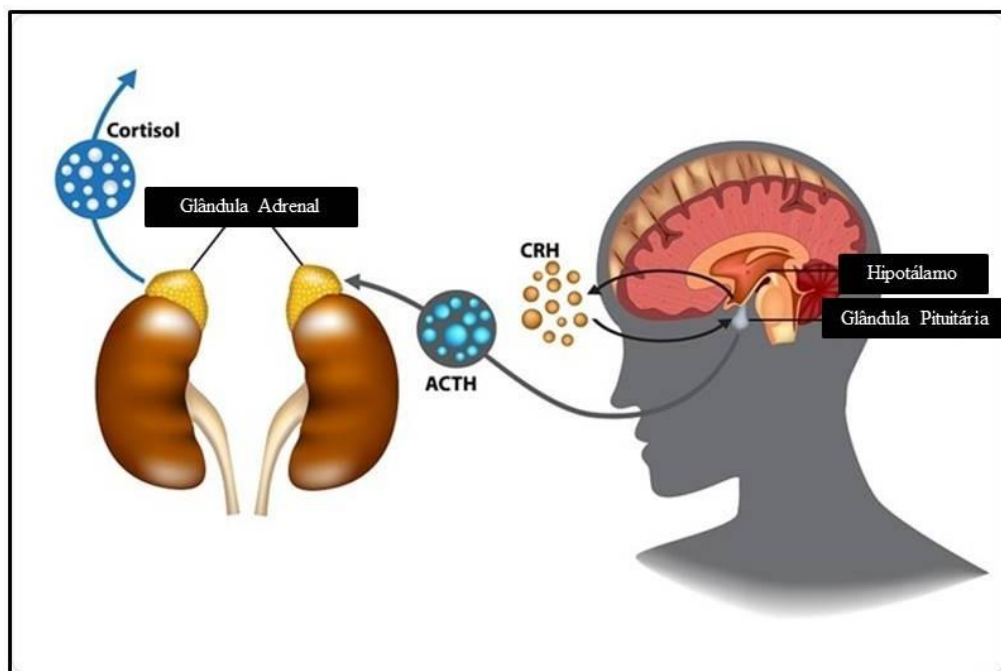
Fonte 11. Adaptado do kenhub.com

O fator de liberação de corticotropina (CRF) é um neuropeptídeo de 41 aminoácidos, pertencente à classe de peptídeos endógenos que atuam como neurotransmissores (DELANEY et al., 2018) e apresentam a função de modular a neurotransmissão de aminas biogênicas, aminoácidos e outros neurotransmissores (NUSBAUM; BLITZ; MARDER, 2017), sendo co-liberados com essas substâncias sob condições de estimulação de alta frequência (DELANEY et al., 2018). Seu padrão de liberação é mais lento e sua duração de ação é prolongada, seja através da sua sinalização por meio da sinapse ou da estimulação da liberação de hormônios na periferia (MAINS; EIPPER, 1999; NUSBAUM; BLITZ; MARDER, 2017).

Atuando como neurotransmissor, o CRF é liberado de neurônios parvocelulares da PVN para várias estruturas cerebrais (DABROWSKA et al., 2013). Apesar de existirem outros receptores, na literatura encontram-se bem descritos a ação desse neuropeptídeo por meio de dois principais receptores, os quais são expressos tanto em neurônios quanto em astrócitos (BEHAN et al., 1995), sendo ambos primariamente acoplados à proteína G estimulatória (Gs): 1) o receptor CRF-R1, codificado pelo gene CRHR1, que tem maior afinidade para CRF e tem padrão de expressão relativamente difundido no cérebro e 2) o receptor CRF-R2, codificado pelo gene CRHR2, com menor afinidade pelo CRF e padrão de expressão mais restrito (KETCHESIN; STINNETT; SEASHOLTZ, 2017). Além dos receptores, o sistema CRF também inclui a proteína de ligação ao CRF (CRFBP), uma glicoproteína codificada pelo gene CRHBP e amplamente expressa no cérebro e colocalizada com o CRF, com função de modular a atividade do CRF sobre seu receptor (KETCHESIN; STINNETT; SEASHOLTZ, 2017; MANTSCH, 2022a).

O sistema CRFérgico hipotalâmico está envolvido nos processos de resposta adaptativa aos fatores estressantes e, de uma forma geral, essa resposta ocorre pela ativação de células neurosecretores parvocelulares, dentro no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN), através de entradas glutamatérgicas e noradrenérgicas, e consequente liberação do hormônio CRF nos vasos portais hipofisários da hipófise anterior (glândula pituitária) (MUNIER et al., 2023). O CRF se liga aos receptores CRFR1 na glândula pituitária e ativa a liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) na circulação sistêmica. Ao atingir a glândula adrenal, o ACTH se liga em receptores de melanocortina tipo 2 (MC2-R) e estimula a síntese e liberação de glicocorticoides (CORT) na circulação sistêmica (RASIAH; LOEWEN; BAINS, 2023; SMITH; VALE, 2006), desempenhando, desta forma, importante papel nos processos biológicos (MAINS; EIPPER, 1999; NUSBAUM; BLITZ; MARDER, 2017).

Figura 11. Figura representativa do CRF agindo na glândula pituitária e ativando a liberação do ACTH na circulação sistêmica. Ao atingir a glândula adrenal, o ACTH estimula a síntese do cortisol sistêmico.



Fonte 12. Adaptado do estudo realizado por (NICOLAIDES; CHROUSOS, 2018).

O CRF atua na modulação de funções como regulação da alimentação (CHEN et al., 2010), flutuação da temperatura (CHEN et al., 2014), de comportamentos como a ansiedade, alterações de humor tipo a depressão e estresse-pós-traumático (KORMOS; GASZNER, 2013; ROTZINGER; LOVEJOY; TAN, 2010).

O sistema CRFérgico também está envolvido na interface entre redes cerebrais que processam estímulos emocionais negativos e aqueles envolvidos no processamento de recompensa e motivação, sendo alvo de estudos que buscam entender como estímulos aversivos em nosso ambiente podem levar ao comportamento e contribuir para o distúrbio do uso de substâncias, como por exemplo, o abuso de etanol (MANTSCH, 2022b).

O ETOH pode ser considerado como um fator estressante por si só e estudos tem demonstrado que tanto o consumo prolongado e excessivo de etanol, assim como a experiência de abstinência, desencadeia uma série de mudanças neuroadaptativas (BECKER, 2017a) através da desregulação progressiva dos sistemas de recompensa e estresse do encéfalo (BECKER, 2017a; KOOB, 2003; PUCCI et al., 2019c). O etanol ativa tanto o eixo HPA através da liberação do CRF hipotalâmico com consequente liberação do cortisol sistêmico, quanto o sistema de recompensa, através da liberação de DA no estriado (KOOB; VOLKOW, 2010b; SIMON et al., 2023a). Após o uso repetido e na ausência do etanol, o sistema CRFérgico extra-

hipotalâmico medeia a ativação da circuitaria na amígdala estendida, funcionando como um sistema anti-recompensa, levando o usuário à síndrome de abstinência, facilitando a recaída (CARRASCO; VAN DE KAR, 2003; KOOB; VOLKOW, 2010b).

Esses efeitos modulatórios do ETOH no eixo HPA e na expressão de CRF ainda não são completamente elucidados e estudos tem demonstrado que tanto o padrão e o tempo de administração do ETOH, quanto a região do encéfalo e a idade dos animais ao iniciarem o uso podem alterar a responsividade desse sistema (ALLEN; RIVIER; LEE, 2011).

Simon e companheiros (2023), demonstraram que tanto a intoxicação por administração intraperitoneal de ETOH (3g/kg) quanto a abstinência aumentaram a expressão de mRNA de CRF no hipotálamo dos animais e elevaram as concentrações plasmáticas de ACTH e CORT, sendo observado também que esse efeito estimulatório foi reduzido pela administração central de antalarmina, um antagonista seletivo de CRF1 (SIMON et al., 2023a).

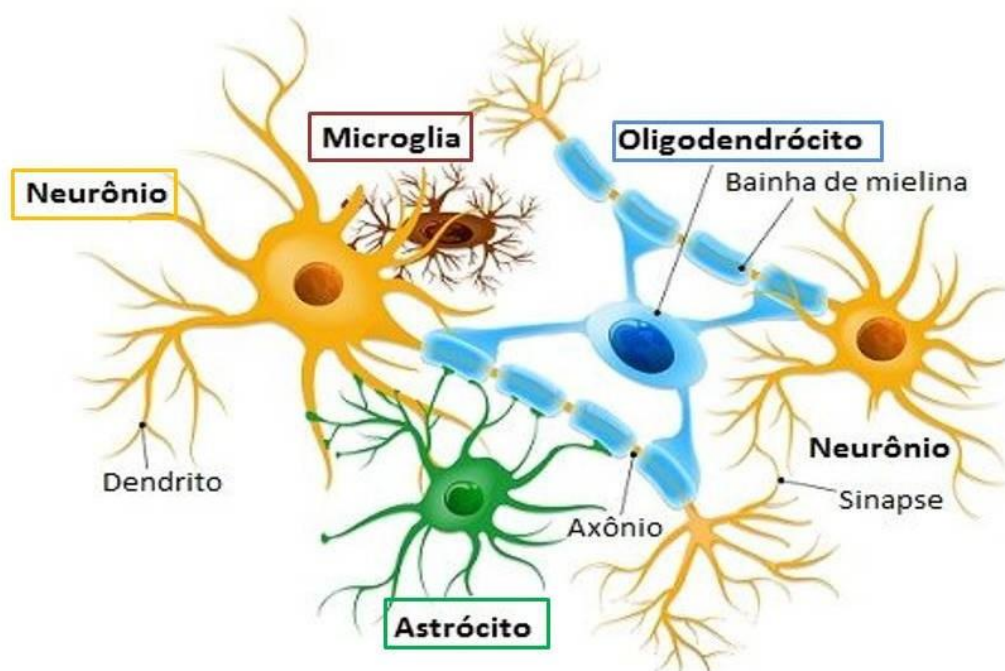
Szymanska (2011) demonstraram, em ratos *wistar*, que o consumo de ETOH tipo binge, na adolescência tardia (PND 37-44), aumentou a expressão de mRNA de CRF no PVN (PRZYBYCIEN-SZYMANSKA et al., 2011). De forma contrária, Allen (2016) demonstrou que a exposição intermitente crônica ao vapor de ETOH durante a primeira fase da adolescência (PND 28-42) de ratos Sprague Dawleys levou a diminuição na concentração de CORT no plasma desses animais e não alterou a expressão de mRNA de CRF no PVN, após um desafio ao ETOH (ig; 3,6g/kg), quando esses animais estavam na fase adulta (PND 70) (ALLEN et al., 2016). Nos estudos anteriores, observou-se uma diferente responsividade do CRF entre os animais que iniciaram o uso na adolescência tardia *versus* a primeira adolescência e, como já descrito anteriormente, apesar de ainda incerto a relação da idade com os mecanismos subjacentes do uso do ETOH, esses estudos evidenciaram que a adolescência é um período de grande vulnerabilidade aos efeitos do ETOH e demonstraram que os efeitos dessa substância sobre o sistema CRFérgico, nesse período, podem acarretar em alterações neurológicas e comportamentais duradouras (SCHREIBER; GILPIN, 2018b).

1.7.2 Relação das Células da Glia e da administração de Etanol

As células da glia, também conhecidas como neuróglias, constituem a maior população de células do encéfalo; participam da formação, manutenção e modulação dos circuitos sinápticos e são compostas por três diferentes populações de células, entre elas: os oligodendrócitos, os astrócitos e as micróglias (FERREIRA et al., 2024).

Os oligodendrócitos são fundamentais para a comunicação neuronal, fornecem suporte aos axônios facilitam a transmissão do potencial de ação através da mielinização (ROTH; NÚÑEZ, 2016). Os astrócitos têm a capacidade de participar ativamente de quase todos os processos que estão associados à homeostase neuronal: fornecem suporte metabólico aos neurônios, participam da remoção de resíduos metabólicos, removem o glutamato da fenda sináptica, regulam as concentrações de potássio e regulam a neuroinflamação (HAROON; MILLER; SANACORA, 2017; SOFRONIEW; VINTERS, 2010). As micróglia, também conhecidas como macrófagos residentes do SNC (PRINZ et al., 2021), são as menores células da neuroglia, possuem corpo celular alongado e com muitos prolongamentos curtos. Elas tem função fagocitária, são as células responsáveis pela defesa imunológica do sistema nervoso central e regulam as podas e plasticidades sinápticas, neurogênese e os processos de neuroinflamação (NAYAK; ROTH; MCGAVERN, 2014).

Figura 12. Imagem representativa de algumas das células do SNC: neurônios (amarelo) e células da glia (oligodendrócitos, em azul; astrócito, em verde; micróglia, em marrom).



Fonte 13. Adaptado de [Neuron 'glue' turns out to be crucial to man's internal timers | The News Town](#)

Antes vistos como elementos de suporte passivo para os neurônios, agora está claro que tanto a micróglia quanto os astrócitos podem regular ativamente muitos aspectos da função neuronal, incluindo liberação de neurotransmissores, regulação de genes, eletrofisiologia,

morfologia dendrítica, conectividade sináptica e viabilidade celular (EROGLU; BARRES, 2010; PEREA; SUR; ARAQUE, 2014), além de também serem sensíveis à degeneração induzida pelo uso de substâncias, como o ETOH (KORBO, 1999).

Em um estudo realizado em ratos, utilizando administração de ETOH, foi observado que essa substância foi metabolizada diretamente tanto pelos neurônios quanto pelos astrócitos e que, quando submetidos à exposição crônica ao vapor de ETOH, aumentou-se ainda mais a oxidação dessa substância nos astrócitos (WANG et al., 2013).

No estudo realizado por Grifasi (2019), utilizando o modelo de consumo de ETOH “*drink-in-the-dark*” em camundongos, foi demonstrado que esse consumo excessivo de três ciclos (4 dias de consumo/ciclo) levou ao aumento na imunoreatividade de células marcadas com a proteína ácida fibrilar glial (GFAP, sigla do inglês: *Glial Fibrillary Acidic Protein*), marcador utilizado para verificar alteração morfológica e ativação de astrócitos (GRIFASI et al., 2019b).

Também foi demonstrado que a micróglia, tanto de humanos quanto de animais, pode ser muito sensível ao tratamento com etanol e que diferentes tipos de exposições a essa substância podem promover alterações mal adaptativas na sinalização neuroimune, sendo que durante a dependência, ocorre aumento no perfil pró-inflamatório das micróglias (GRIFASI et al., 2019a; MELBOURNE et al., 2021a; NELSON et al., 2021).

No estudo realizado por Nelson (2021), utilizando o modelo de consumo de ETOH “*drink-in-the-dark*” em camundongos, foi demonstrado que o consumo excessivo de etanol levou ao aumento na imunoreatividade e no número de células marcadas com a molécula adaptadora de ligação de cálcio ionizado-1, marcador específico para detectar micróglia (IBA-1, sigla da palavra em inglês: *Ionized Calcium Binding Adaptor Molecule 1*).

Estudos sobre transcriptomas realizados em humanos “alcoólicos” (entende-se pela tradução do inglês que seriam consumidores dependentes de ETOH) e animais expostos ao etanol de forma crônica identificaram alterações gênicas relacionadas à função glial, as quais podem regular comportamentos relevantes para o AUD (ERICKSON et al., 2019a; MELBOURNE et al., 2021b). Evidências recentes sugerem que o uso crônico de etanol e o processo inflamatório crônico a ele associado, pode culminar em processos neurodegenerativos, neuropatologias, além de déficit cognitivos (CREWS; VETRENO, 2014; KELLEY; DANTZER, 2011). Acredita-se que durante a fase de abstinência alguns desses danos degenerativos são revertidos, pois melhora cognitiva é observada nos pacientes (NIXON et al., 2008; WALTER; CREWS, 2017). Entretanto, como ainda se sabe pouco sobre o

comportamento das células da glia durante o período de abstinência protraída induzida pelo uso crônico de etanol durante a adolescência, este estudo teve como foco avaliar a ativação das micróglias e astrócitos após esse longo período sem a ingestão de ETOH.

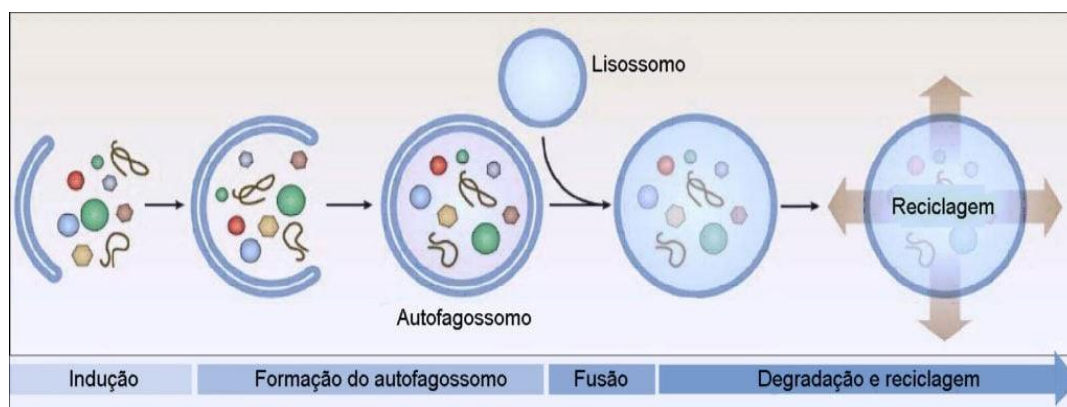
1.7.3 Relação entre Autofagia e administração de Etanol

A autofagia é um sistema de degradação lisossomal intracelular, conservada evolutivamente em células eucarióticas, envolvida com a reciclagem de macromoléculas e organelas celulares. Este processo é essencial para a homeostase, sobrevivência, diferenciação, desenvolvimento e desempenha importante papel em uma ampla variedade de condições fisiológicas e fisiopatológicas (GLICK; BARTH; MACLEOD, 2010), além de ter papel fundamental nas respostas adaptativas a algum tipo de estresse celular (FENG et al., 2014).

Diversas são as vias conhecidas de regulação da autofagia: microautofagia, autofagia mediada por chaperonas e macroautofagia. A microautofagia é um processo de degradação não seletivo que envolve componentes citosólicos e proteases lisossomais (WANG; KLIONSKY; SHEN, 2022). Na autofagia mediada por chaperonas somente proteínas específicas, que são reconhecidas por um complexo de chaperonas são degradadas e não há formação de vesículas (BEJARANO; CUERVO, 2010). A macroautofagia, foco do nosso estudo e referenciada a partir daqui apenas como “autofagia”, envolve a formação de vesículas denominadas autofagossomos, os quais se fundem com os lisossomos e formam os autolisossomos (KLIONSKY et al., 2021). A degradação do conteúdo é feita pela ação de enzimas lisossomais como as hidrolases ácidas e catepsinas (KLIONSKY et al., 2021).

A autofagia é formada por cinco eventos distintos: indução, nucleação, alongamento, fusão e degradação/reciclagem (YIN; PASCUAL; KLIONSKY, 2016), os quais estão representados na figura 13 abaixo.

Figura 13. Imagem representativa da sequência de formação do autofagossomo/autolisossomo na macroautofagia (autofagia) indicando os cinco principais eventos distintos: indução, nucleação, alongamento, fusão e degradação/reciclagem.



Fonte 14. Adaptado (MIZUSHIMA, 2007).

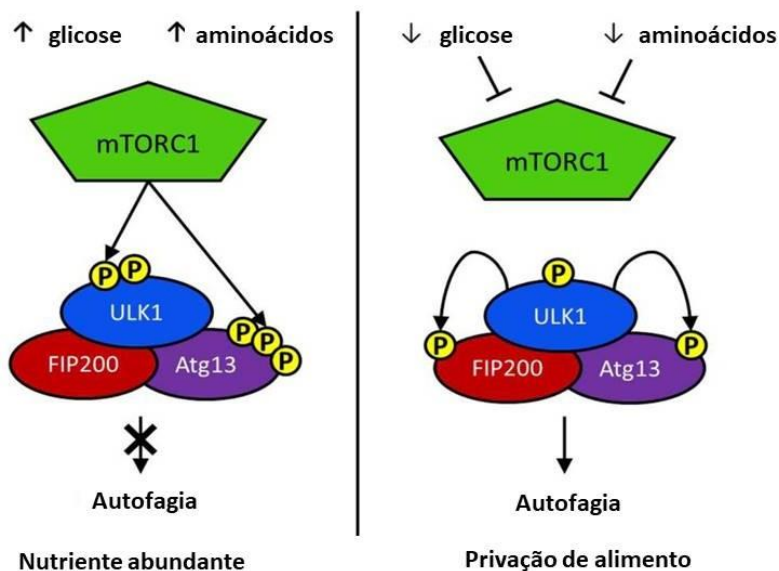
A primeira etapa, indução, é caracterizada pela formação do fagóforo e para que isso ocorra, uma série de complexos proteicos são recrutados (RABINOWITZ; WHITE, 2010). Portanto, após algum estímulo estressor, mudança no ambiente extracelular ou baixa disponibilidade de nutriente, uma cascata de sinalização é iniciada e regulada por um complexo proteico conhecido como mTORC1 (alvo mecanístico do complexo de rapamicina 1 em mamíferos; do inglês: *mammalian Target Of Rapamycin Complex 1*), o qual é um componente chave na detecção de nutrientes (aminoácidos e glicose) e fatores de crescimento que controlam o metabolismo celular (JUNG et al., 2010; BEJARANO; CUERVO, 2010; YIN; PASCUAL; KLIONSKY, 2016). Esse complexo também regula vários processos bioquímicos incluindo a tradução, a própria autofagia, transcrição e biossíntese lipídica, as quais induzem o estado anabólico e promovem o crescimento e proliferação celular (TAKEI et al., 2014; TAKEI; NAWA, 2014).

mTORC1 é um complexo proteico formado pelas: proteína quinase mTOR, Raptor, mLST8, DEPTOR e PRAS40 (PARK; LEE; BLENIS, 2020). A ativação desse complexo promove aumento da síntese proteica e do crescimento celular, enquanto o silenciamento da mTORC1, promovido por estímulos como privação de alimento e estresse, ativa processos autofágicos para restauração dos níveis de aminoácidos (KHAMSING et al., 2021).

O complexo mTORC1 e alterações na fosforilação de seus dois principais substratos, o complexo ULK1 (sigla do inglês: *Unc-51-like kinase 1*) e a proteína ribossômica p70S6 quinase (p70S6K), regulam direta ou indiretamente, respectivamente, a cascata da autofagia (FIMIA; PIACENTINI, 2010). Quando ativada, a mTORC1 se dissocia do complexo ULK1 e inicia a autofagia, seguindo as etapas de nucleação e alongamento (SHIMOBAYASHI;

HALL, 2014).

Figura 14. Iniciação via complexo ULK1: em condições de nutriente abundante, o complexo regulador mTORC1 reprime a ativação da autofagia através da fosforilação de um resíduo de serina em ULK1. A privação de glicose ou aminoácidos resulta na repressão da ativação do mTORC1. Consequentemente, o ULK1 fosforila tanto o FIP200 quanto o Atg13, resultando na ativação de proteínas efetoras da autofagia a jusante.



Fonte 15. Imagem adaptada e traduzida de (RANDALL-DEMLLO; CHIEPPA; ERI, 2013).

A etapa de nucleação se inicia pela ativação do complexo ULK1 e recrutamento de outros complexos que serão cruciais para a nucleação do autofagossomo (MATSUNAGA et al., 2009). Na etapa de alongamento, diversas outras proteínas são necessárias para auxiliar o alongamento da membrana do fagóforo, mas para essa tese, focaremos apenas nas proteínas que foram alvo do estudo e desempenham importante papel na formação do autofagossomo, sendo elas: a cadeia leve de proteína associada à microtúbulos (LC3; do inglês: *microtubule-associated protein light chain 3*) (YANG; KLIONSKY, 2010) e a p62 (SQSTM1/p62) (KOMATSU et al., 2007).

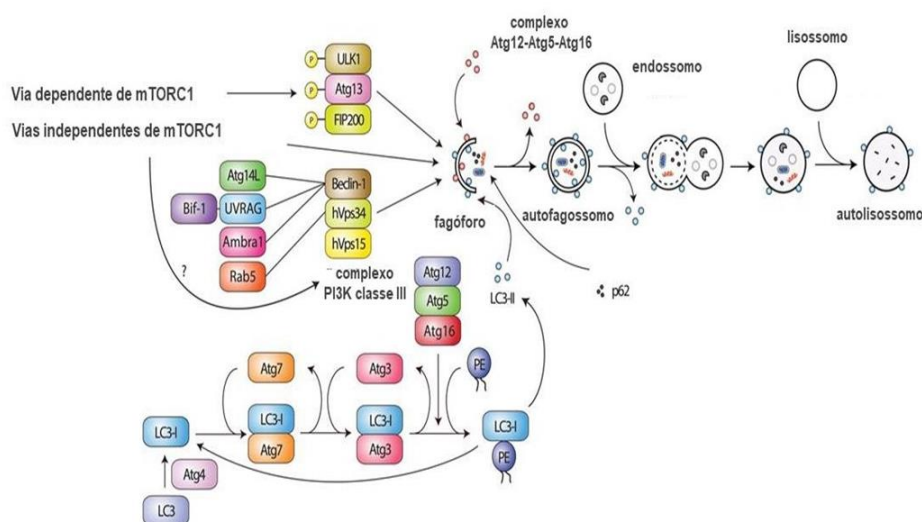
A LC3 é inicialmente encontrada na forma de pró-LC3 e, após sofrer clivagem, forma a LC3-I, que pode ser encontrada no citosol. A LC3-I é então conjugada à fosfatidiletanolamina e forma a LC3-II, que passa a ser encontrada associada à membrana do autofagossomo, local em que permanece até o final do processo autofágico. A taxa de conversão da proteína LC3-I em LC3-II normalmente é utilizada como marcador da formação do autofagossomo. Quando analisadas pela técnica de *western blotting*, durante um curto período de estresse, por exemplo,

normalmente a banda de expressão de LC3-I encontra-se diminuída, enquanto a de LC3-II aumentada; entretanto, após um longo período de estresse, ambas as bandas das proteínas podem diminuir ou desaparecer devido a degradação da LC3-II promovida pelas próprias enzimas internas do autolisossomo (MIZUSHIMA; YOSHIMORI; OHSUMI, 2011; RABINOWITZ; WHITE, 2010).

A proteína p62 é uma proteína adaptadora multifuncional, interage com a LC3-II e desempenha importante papel no fluxo autofágico, sendo incorporada pelo autofagossomo e permanecendo lá até o final do processo autofágico. Apesar da expressão de p62 poder ser alterada por mecanismos independentes da autofagia, o acúmulo dessa proteína, associado às alterações em outras proteínas da via autofágica, pode ser indicativo da supressão da autofagia (ICHIMURA et al., 2008).

O estágio final do processo autofágico consiste na degradação lisossomal das macromoléculas no citosol, as quais serão utilizadas como substratos para a biossíntese de novas moléculas ou produção de energia (RABINOWITZ; WHITE, 2010).

Figura 15. Via autofágica em mamíferos e suas proteínas reguladoras. A autofagia é iniciada pela formação de fagóforos no citoplasma. Os autofagossomos se fundem com os endossomos que em seguida se fundem aos lisossomos para formar os autolisossomos onde a carga autofágica é degradada. A autofagia pode ser controlada por vias dependente ou independente de mTORC1. A proteína LC3-II é um marcador específico da formação de autofagossomos na autofagia e é degradado nos autolisossomos, bem como a p62.



Fonte 16. Adaptado (SARKAR, 2013).

Alterações na autofagia têm sido vistas em diversas patologias humanas, incluindo infecções (LEVINE; MIZUSHIMA; VIRGIN, 2011), doenças cardiovasculares (LAVANDERO et al., 2013), doenças metabólicas (LAVALLARD et al., 2012), câncer (WHITE, 2012; LIU, HE; SIMON, 2013; LORIN et al., 2013) e processos inflamatórios e neurodegenerativos (JIANG; MIZUSHIMA, 2014). Além disso, tanto a autofagia aumentada quanto a deficiência nesse processo tem sido observada em lesões cerebrais agudas incluindo as induzidas pelo ETOH (CHEN; KE, 2012; HARA; NAKAMURA, 2006).

No SNC, a autofagia é fundamental para a manutenção das funções dos neurônios e das células da glia (PLA; PASCUAL; GUERRI, 2016a; PLAZA-ZABALA; SIERRA, 2024), participando do remodelamento sináptico e da plasticidade associada à formação da memória de longo prazo (NIKOLETOPOULOU; PAPANDREOU; TAVERNARAKIS, 2015). Disfunções dos principais componentes autofágicos levam à neurodegeneração progressiva e defeitos morfológicos pré e pós-sinápticos (NIKOLETOPOULOU et al., 2017). Estudos demonstraram que camundongos *knockout* para células neurais específicas apresentaram acúmulo de corpos de inclusão em seus neurônios e desenvolveram déficits progressivos na função motora, sugerindo que a autofagia basal no cérebro é importante para prevenir o acúmulo de proteínas anormais, para preservar a função neural e proteger contra a neurodegeneração (HARA; NAKAMURA, 2006).

O efeito do etanol sobre a autofagia pode depender da duração do seu tratamento, da quantidade de etanol na dieta, do modo como ele é administrado e, possivelmente, de outros fatores dietéticos ou ambientais. Alguns estudos demonstraram que o tratamento agudo com etanol pode ativar a autofagia hepática *in vivo* e em hepatócitos primários cultivados e que essa ativação requer a supressão da mTORC1 (*mammalian Target Of Rapamycin*) (DING; 2010; THOMES, 2012). Em um modelo animal de Lieber-DeCarli de baixo teor de gordura, o tratamento alcoólico crônico também mostrou promover elevação da autofagia quando o etanol foi administrado em dose mais baixa (respondendo por 29% da necessidade calórica), mas apresentou sinais de supressão nessa via quando o etanol foi dado em uma dose mais alta (36% da necessidade calórica) (LIN, 2013). O etanol pode causar muitas outras alterações celulares, incluindo inibição do proteassoma, inibição do lisossomo, estresse do retículo endoplasmático e acúmulo de proteínas agregadas, todas podendo estar associadas à função autofagia (LI et al., 2014).

Os efeitos do consumo crônico do etanol na autofagia ainda não são bem compreendidos, em alguns casos, são contraditórios e a maioria dos estudos avalia o processo

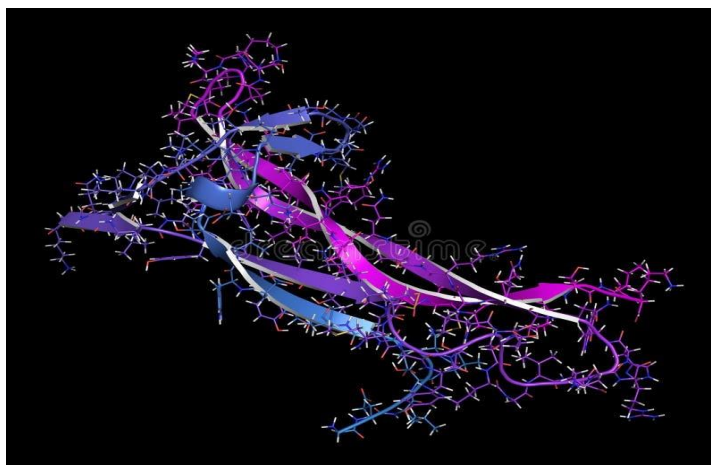
autofágico no fígado de animais submetidos ao uso crônico de etanol (MENK et al., 2018a). Entretanto, pouco ainda se sabe sobre os efeitos do uso crônico do etanol durante a adolescência e do fluxo autofágico na abstinência protraída no SNC, especificamente, na região do hipocampo.

1.7.4 Relação entre Neuroplasticidade e administração de ETOH

O termo neuroplasticidade ou plasticidade neuronal se refere ao processo intrínseco de remodelação do sistema nervoso central no qual, através de estímulos internos ou externos, promovem o fortalecimento ou enfraquecimento de conexões sinápticas conferindo a adaptabilidade e a aprendizagem do mesmo (APPELBAUM et al., 2023; CASTRÉN; ANTILA, 2017). Esse processo envolve tanto fatores atróficos, ou seja, responsáveis pela eliminação de neurônios inativos, quanto fatores neurotróficos, responsáveis pela síntese proteica, transcrição gênica e neurogênese (HOLTMAAT; CARONI, 2016). Os primeiros fatores neurotróficos foram descobertos através de sua capacidade de sustentar/promover a sobrevivência e o crescimento de neurônios, sendo eles o NGF (fator de crescimento nervoso; traduzido do inglês: *nerve growth factor*) e o BDNF (fator neurotrófico derivado do cérebro; traduzido do inglês: *brain-derived neurotrophic factor*) (CASTRÉN; ANTILA, 2017).

O BDNF, representado na **figura 16**, é uma das neurotrofinas mais abundantes no SNC e pertence a uma família de fatores de crescimento a qual inclui outras proteínas como neurotrofina-3, o próprio NGF e a neurotrofina-4/5, podendo ser encontrado na retina, no hipocampo, córtex, tronco-cerebral e também no músculo esquelético (BINDER; SCHARFMAN, 2004). A expressão do gene do BDNF (mRNA-*Bdnf*) é regulado por estímulos internos e externos como estresse, danos cerebrais e exercício físico (AID et al., 2007). Tanto o excesso quanto o bloqueio da sinalização dessa proteína pode alterar o desenvolvimento das regiões do encéfalo (CASTREN et al., 1998).

Figura 16. Estrutura espacial do BDNF.



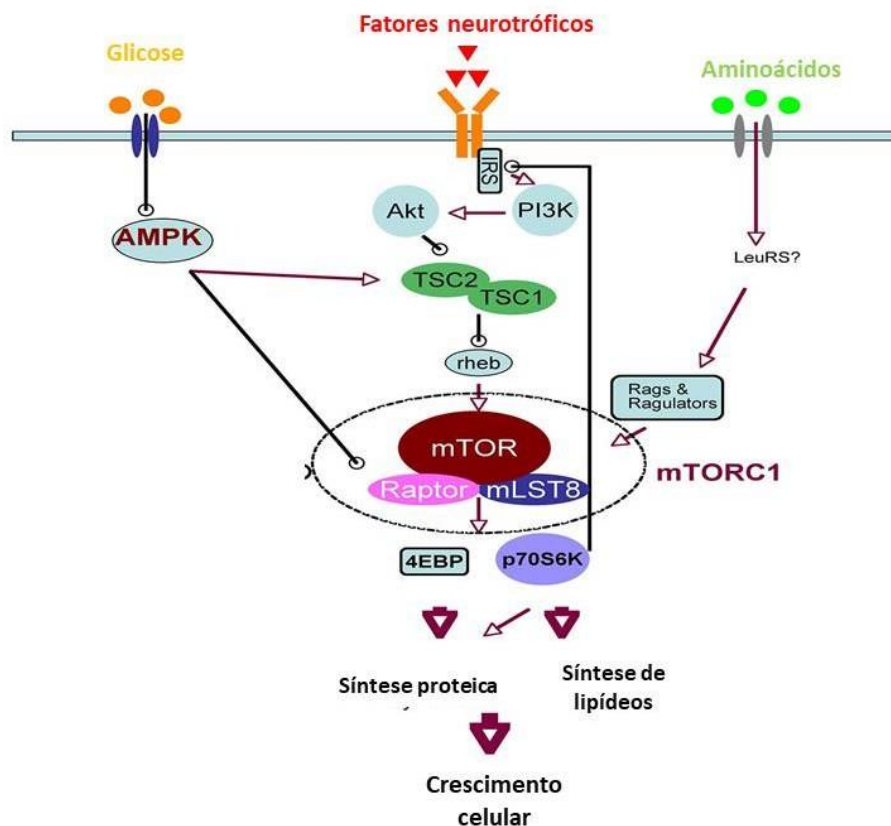
Fonte 17. Imagem retirada do site pt.dreamstime.com (ID 187049697). Acesso em 07/11/2023.

Inicialmente, o BDNF é traduzido como pró-neurotrofina (pró-BDNF), a qual é clivada por endoproteases, no citoplasma, ou por metaloproteinases, na matriz extracelular, originando o BDNF maduro (BINDER; SCHARFMAN, 2004; CASTREN et al., 1998). Os fatores neurotróficos podem se ligar a dois tipos principais de receptores: receptor neurotrofina p75 de baixa afinidade (p75NTR) e receptor de alta afinidade tropomiosina quinase B (TrkB) (BINDER; SCHARFMAN, 2004).

Tanto o pró-BDNF quanto o BDNF maduro podem se ligar ao receptor p75NTR, promovendo a apoptose, morte celular e eliminação de sinapses (GIACOBBO et al., 2019; LU; PANG; WOO, 2005). Por outro lado, quando a forma madura do BDNF se liga ao receptor TrkB, pode ocorrer a ativação de diversas cascatas de sinalização incluindo a proteína quinase ativada por mitógeno-Ras (MAPK), a fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) e a via da fosfolipase C γ (PLC- γ) (MINICHIELLO, 2009), promovendo uma variedade de processos como desenvolvimento neuronal, neuroproteção, plasticidade sináptica, aprendizagem e memória (LOGRIP et al., 2015; LU; NAGAPPAN; LU, 2015).

Estudos demonstraram que a via BDNF-TrkB também participa da regulação da autofagia (AN et al., 2021; CHEN et al., 2013). Esse controle pode ocorrer através da proteína p70S6K, que fosforila alguns fatores de tradução como a proteína ribossômica S6 (pS6) e da 4EBP (proteína de ligação ao fator de iniciação eucariótica 4E; traduzida do inglês: *eukaryotic initiation factor 4E* (*eIF4E*) - binding protein) (COSTA-MATTIOLI et al., 2009) (figura 17).

Figura 17. Ilustração do mecanismo proposto por (CHEN et al., 2013), em que o BDNF ativa a autofagia através do mecanismo regulado pela mTORC1.



Fonte 18. Imagem adaptada e traduzida de (CHEN et al., 2013)

Em contraste ao que foi descrito até então, tem-se relacionado à desregulação na expressão de BDNF, a diversos distúrbios neuropsiquiátricos (AUTRY; MONTEGGIA, 2012) incluindo depressão e esquizofrenia (BUCKLEY et al., 2007), transtorno de ansiedade (ANDERO; CHOI; RESSLER, 2014) e transtorno relacionado ao abuso de drogas (LOGRIP et al., 2015).

Um estudo realizado por Boschen (2015) investigou o impacto da exposição de animais em idade neonatal, ao etanol, na expressão de BDNF e do seu receptor TrkB no hipocampo e córtex pré-frontal. Neste estudo foi observado um aumento na expressão do BDNF e de seu receptor no hipocampo, mas o mesmo não ocorreu no córtex (BOSCHEN et al., 2015). Já em relação à abstinência, Girard (2020) dosou a expressão de BDNF no soro de indivíduos na fase de abstinência, após dois meses sem consumir etanol e encontrou aumento significativo quando comparado ao período inicial da abstinência.

1.8 TRATAMENTOS DA DEPENDÊNCIA ALCÓOLICA E DA SÍNDROME DE ABSTINÊNCIA

Assim como definido anteriormente, o transtorno por uso de substâncias é uma condição crônica e recidiva e, devido aos ciclos de abstinência e recaída serem muito comuns, ainda existe uma alta estigmatização em relação aos tratamentos para esse problema de saúde pública (KEYES et al., 2010; SCHULER et al., 2015). Com o objetivo de reduzir os episódios das recaídas e os efeitos negativos da abstinência, diversos tratamentos foram propostos e, entre eles, as intervenções mais utilizadas são as psicossociais e farmacológicas (RAY et al., 2019).

Os tratamentos psicossociais mais comuns são a terapia de aprimoramento motivacional (ROOZEN et al., 2004a), terapias cognitivo-comportamental (CARROLL; KILUK, 2017; NACE, 1991), terapias baseadas em reforço (ROOZEN et al., 2004b) e mindfulness (GRANT et al., 2017).

Os tratamentos farmacológicos mais utilizados são: Dissulfiram, inibidor irreversível e inespecífico da enzima acetaldeído desidrogenase, que promove acúmulo de acetaldeído no organismo e consequentemente provoca náuseas, vômitos e taquicardia no paciente que faz o uso concomitante desse fármaco e etanol (FULLER et al., 1986); Acamprosato, que inibe a atividade excitatória glutamatérgica, agindo, provavelmente, em uma subclasse dos receptores de glutamato (NMDA), especialmente quando há hiperatividade destes receptores (MASON; HEYSER, 2012); e Naltrexona, um antagonista opioide que pode diminuir os efeitos euforizantes do etanol (UNTERWALD, 2008).

Conforme descrito nos estudos realizados por Ray (2019 e 2020), observou-se que nenhum tratamento isolado apresentou uma real eficácia sobre o AUD, sendo necessário, além da combinação entre essas diferentes modalidades, a assistência prolongada aos pacientes (RAY et al., 2019, 2020).

Dessa forma, o uso de terapias alternativas, como o mindfulness, tem sido um grande aliado no tratamento da dependência e dos problemas neurológicos a ela associados (VOLKOW e LI, 2005; MANTHOU et al., 2016). Dentre outros modelos alternativos de terapia observa-se que a prática de diferentes tipos de exercício físico (EF) é muito utilizada na manutenção da saúde, pois de uma forma geral, esta pode resultar em melhora na qualidade de vida do dependente através do desencadeamento de uma série de adaptações metabólicas, endócrinas e neuro-humorais, além do impacto bio-psico-social positivo e da manutenção da homeostase metabólica (FERREIRA; TUFIK; MELLO, 2001).

1.8.1 Exercício físico sistematizado

Dentre os modelos de EF mais estudados, a corrida apresenta muitos benefícios para saúde como melhora nas funções cognitivas, nos transtornos de humor e sono (COYLE, 1995; DRIVER, 2000). Tem sido relatado, em estudo com modelos animais, que o EF de intensidade moderada é recomendado para aumentar as defesas antioxidantes das células (AGUIAR; PINHO, 2007), aumentar a atividade das enzimas hepáticas envolvidas no metabolismo do álcool (RIGHI et al., 2016), além de promover o controle da hipertensão arterial (STULTSKOLEHMAINEN, 2013) e das funções neurológicas (COTMAN; BERCHTOLD, 2002; KRAMER et al., 2006).

Barchas e Freedman (1963) e Moore (1964) realizaram os primeiros estudos sobre a influência do EF na neuroproteção. Em 2004, Vaynman e companheiros demonstraram que o impacto do EF na plasticidade encefálica pode estar associado à ação do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) (VAYNMAN et al., 2004). Dados da literatura indicam que enquanto o consumo prolongado ou crônico de etanol parece diminuir a expressão de BDNF (DAVIS, 2008; LEASURE e NIXON, 2010), a prática de EF está relacionada com aumento na sua expressão, podendo então ser associado como alternativa para o reestabelecimento dos valores basais desse fator (LIU et al., 2010; SHEN et al., 2013; KIM et al., 2015; KIM e LEEM, 2016).

Kasper e Skriver, (2014) analisaram as concentrações plasmáticas do BDNF, fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1), epinefrina, norepinefrina, dopamina e lactato no início, imediatamente após o EF ou repouso e durante a atividade aeróbica em bicicleta e observaram que o grupo que praticava EF apresentou a concentração de todos os compostos do sangue aumentados imediatamente após o exercício e que esses valores permaneceram elevados por 15 minutos após o exercício, exceto para o BDNF e VEGF (SKRIVER et al., 2014). Pinilla e companheiros (2012) observaram em seus estudos que a regulação epigenética do gene BDNF parece ser um mecanismo biológico pelo qual o EF voluntário pode promover melhora da saúde mental e resistência a distúrbios neurológicos (GOMEZ-PINILLA et al., 2012).

A prática de EF proporciona neuroproteção para diversas condições neurodegenerativas como hipóxia e derrame (LEASURE; NIXON, 2010). O EF moderado crônico causa neuroplasticidades alterando as transmissões dopaminérgica, noradrenérgica e serotoninérgica (LIN e KUO, 2013). Recentemente foi apontado os efeitos positivos do EF no cérebro para melhorar a cognição e recuperação após lesão (ZHAO et al., 2015a) e, ao mesmo tempo,

aumentar a neurogênese do hipocampo e suprimir a neuroinflamação que pode ser prejudicial para ambos (RYAN; NOLAN, 2015). Por exemplo, em camundongos, a corrida voluntária estimulou a proliferação neuronal e melhora na memória espacial e aprendizagem (VAN PRAAG; CHRISTIE; SEJNOWSKI, 1999; VAN PRAAG, KEMPERMANN; GAGE, 1999).

Animais também foram utilizados para avaliar as influências do EF em doenças neurodegenerativas, como Doença de Parkinson e lesão cerebral traumática (TCE), demonstrando o potencial do EF para aliviar tanto os sintomas comportamentais / motores, como os déficits neuroquímicos (PETZINGER et al. 2007; TAJIRI et al. 2010; LAU et al. 2011; REAL et al. 2013; GOES et al. 2014; KWOK et al. 2016; LAHUE et al. 2016). Chio e companheiros (2017) observaram que o EF em esteira, realizado por 5 dias na semana durante 3 semanas, inibiu tanto as lesões neurológicas quanto seis genes pró-inflamatórios e / ou neurodegenerativos (Cxcl10, IL-18, IL-16, Cd70, Mif, and Faslg), além de potencializar quatro genes anti-inflamatórios e / ou neuroregenerativos (Bmp6, IL-10, IL-22, and IL-6) (CHIO et al., 2017).

Zhao e colaboradores (2015) demonstraram que o EF voluntário realizado em por 4 semanas em um modelo experimental de traumatismo cranioencefálico (TCE) melhorou a recuperação do desempenho sensório-motor, nas funções cognitivas / afetivas e no reconhecimento de objeto. Além disso, os animais que praticaram EF antes do TCE apresentaram o tamanho da lesão reduzida, atenuação da perda neuronal no hipocampo, no córtex e no tálamo e diminuição na ativação microglial no córtex (ZHAO et al., 2015b).

Apesar de muitos estudos evidenciarem os efeitos positivos do exercício físico, tanto como preventivo quanto como auxiliar no tratamento de diversas doenças/transtornos, pouco se sabe sobre o efeito do exercício físico na abstinência protraída, após o uso crônico de etanol realizado durante o período de adolescência dos animais.

2. HIPÓTESE

Levantamos a hipótese de que a administração crônica de etanol durante a adolescência provocaria alterações duradouras no sistema CRFérgico, sinalização neuro imune e na expressão de proteínas autofágicas e plásticas, as quais seriam recuperadas com a realização do exercício físico, realizado na abstinência protraída.

3. OBJETIVOS

O objetivo geral do presente projeto foi avaliar os efeitos moleculares neurais e comportamentais da prática do exercício físico como tratamento coadjuvante na abstinência protraída, em camundongos *swiss* submetidos a diferentes protocolos de intoxicação de etanol durante a adolescência.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

3.1.1. Avaliar as alterações nas expressões dos genes CRF, CRF1 e CRFBP, na região do hipocampo dorsal, após a prática do exercício físico na abstinência protraída, nos animais intoxicados e/ou não por etanol;

3.1.2 Quantificar alterações no padrão de consumo voluntário de etanol antes, durante e após a exposição cíclica à câmara de vapor e ao exercício físico;

3.1.3 Quantificar alterações no padrão de expressão de células gliais, no hipocampo, após intoxicação de etanol e à prática do exercício físico na abstinência protraída;

3.1.4 Quantificar alterações no padrão de consumo voluntário de etanol em animais submetidos ou não ao isolamento social durante a primeira fase da adolescência;

3.1.5 Avaliar o perfil comportamental dos animais submetidos ou não ao isolamento social, à intoxicação de etanol e ao exercício físico na abstinência protraída;

3.1.6 Quantificar alterações na modulação da expressão de proteínas associadas aos processos autofágicos e plásticos, na região do hipocampo, após a intoxicação de etanol e do exercício físico na abstinência protraída;

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Paulo (CEUA/UNIFESP) (nº 6005080818). Foram utilizados camundongos machos *Swiss* (Peso: 20-40g/ idade: a partir de 21 dias) provenientes do Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia (CEDEME–UNIFESP). Os animais foram transferidos para o biotério de experimentação animal Leal Prado- UNIFESP e foram mantidos sob condições controladas de temperatura ($23 \pm 2^{\circ}\text{C}$) e luz (ciclo 12/12h; com início da fase clara às 6h e da fase escura às 18h), com livre acesso a ração e água, exceto durante a realização dos testes. Os animais foram mantidos em suas caixas moradia confeccionadas de polisulfona (20,7 x 21,6 x 31,6 cm), de forma isolada ou com mais

3 camundongos, de acordo com a necessidade de cada experimento.

4.2 SUBSTÂNCIAS

- Salina (NaCl) 0,9% p/v;
- Etanol 95 % (utilizado para a câmara de vapor);
- Etanol 20% v/v (obtido a partir da solução de 99,5%, Dinâmica, São Paulo, Brasil), diluído em solução salina (0,9% p/v) para administração intraperitoneal (i.p.);
- Etanol 10% v/v (obtido a partir da solução de 99,5%, Dinâmica, São Paulo, Brasil), utilizado para consumo no IA2BC;
- Cetamina (80mg/kg; Anasedan Cevo®, i.p.);
- Xilasina (10mg/kg; Dopalen Cevo®, i.p.);
- Fentanil® (0,02mg/kg; Jansen®, subcutânea);
- Acepromazina (2,0 mg/kg; subcutânea);
- Isoflurano (Cristália®, 5%);

4.3 ESTEIRA DE EXERCÍCIO FÍSICO

Foi utilizada a esteira digital motorizadas da MasterOne® (dimensões externas: 85 cm x 80cm x 70 cm e área de exercício para camundongo 40 cm x 5 cm x 10 cm). Esteira que possui baias para 8 camundongos, faixa de velocidade de 10 à 100 cm/s com controle de velocidade digital com indicador de tempo e distância percorridos. A esteira permite ajuste de inclinação de -10 a 10 graus. Embora a esteira possua uma grade de choque no fundo de cada baia, essa permaneceu inutilizada.

Figura 18. Esteira da empresa MasterOne®, utilizada para o treinamento de corrida forçada dos camundongos dos grupos exercitados.



Fonte 19. Foto tirada pela autora durante o experimento.

4.4 O SISTEMA DA CÂMARA DE VAPOR DE ETANOL

O sistema foi fabricado pela empresa AVS Projetos (São Carlos - SP), ilustrado na figura 19, é composto por oito caixas de acrílico herméticas, tampadas e fixadas por grampos de metal. Em uma das laterais, há dois orifícios, um com o conector para a entrada de ar e vapor de etanol e o outro com um conector para a saída do ar. As tampas e os orifícios foram vedados por borracha em todo seu perímetro, para evitar as trocas de ar com o ambiente. Assim, as caixas moradias dos animais ficaram condicionadas dentro desse sistema hermético, com livre acesso a água e a comida. O vapor de etanol foi produzido pelo gotejamento de etanol 95% em um frasco térmico (balão volumétrico de 5L) mantido a 70°C em uma manta de aquecimento e possui exposição controlada por válvulas de fluxo de ar e pelo fluxo de gotejamento, responsável por manter a concentração sanguínea de etanol entre 150 e 250 mg/dL. O oxigênio, controlado também pelas válvulas de fluxo, foi ejetado por um compressor para o fundo do frasco a uma taxa de 5 L/min para misturar-se com o etanol. Todo o sistema foi controlado por uma alimentação elétrica.

Figura 19. Imagem ilustrativa do sistema de vapor construído pela empresa AVS Projetos e utilizado nesse estudo.



Fonte 20. Foto tirada pela autora durante o experimento.

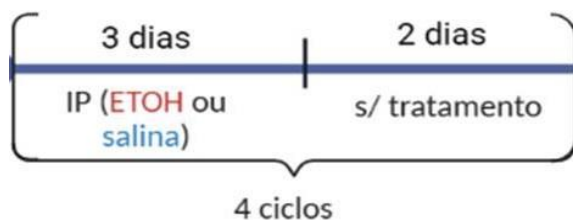
4.5 PROTOCOLOS DE ISOLAMENTO SOCIAL:

Os camundongos chegaram ao biotério de experimentação animal com 21 dias de idade e foram alojados individualmente (grupo isolado) ou em grupos de 3 a 4 animais por caixa (agrupados ou sociáveis), em mini-isoladores da Linha ALN2 (Alesco, Brasil), que são confeccionados em polisulfona (20,7 x 21,6 x 31,6 cm). Durante esse período os animais foram manipulados apenas para a troca das caixas, que aconteceu duas vezes por semana. A partir do dia pós-natal (DPN) 21, considerado como a fase da primeira adolescência para os camundongos (CORTES; CORDER; DOBRUNZ, 2021; CRUZ et al., 2016; DUARTE et al., 2015), os animais foram submetidos à intoxicação de etanol (3.8). Os camundongos permaneceram sob as mesmas condições de alojamento (isolados ou agrupados, de acordo com o grupo experimental) até o término de todos os procedimentos experimentais.

4.6 ADMINISTRAÇÃO INTRAPERITONEAL DE ETANOL (IPe) OU SALINA (IPs)

O protocolo utilizado foi adaptado dos estudos realizados por Vore (2017) e Salguero (2020). Os animais receberam injeção intraperitoneal de salina (grupo controle) ou etanol (grupo experimental) (2,5 g/kg de etanol), uma vez ao dia, durante 3 dias. Depois foram mantidos por dois dias em suas gaiolas moradias sem receberem nenhum tratamento. Em seguida foram submetidos mais 3 vezes a esse ciclo de 3 dias IP_(ETOH/salina)/2 dias sem tratamento, como ilustrado na figura 20.

Figura 20. Representação esquemática dos ciclos de administração intraperitoneal: 4 ciclos, sendo 3 dias IP (ETOH/salina) / 2 dias retirada da substância.



Fonte 21. Desenho esquemático feito pela autora.

4.7 CONSUMO DE LÍQUIDOS NO MODELO: ACESSO INTERMITENTE DE LIVRE ESCOLHA (IA2BC)

Para análise do consumo voluntário de etanol no experimento 2 e 3, os animais foram removidos de suas gaiolas moradias e alocados individualmente em caixas acrílicas com livre acesso a duas garrafas de 50 ml cada, uma contendo solução de etanol 10% (v/v) e a outra contendo água filtrada (IA2BC), durante 4 horas por dia. Ao final, os animais retornavam para suas caixas moradias e eram mantidos em suas caixas moradia de acordo com os experimentos: agrupados com 4 animais (experimento 4.2) e isolados e/ou agrupados com 4 animais (experimento 3). O acesso intermitente ocorreu três vezes na semana (segunda, quarta e sexta), sendo mantido ao longo de quatro semanas.

A medida do consumo de etanol e água foi realizada através da pesagem das garrafas antes e após as 4 horas de consumo e os dados foram apresentados como média semanal dos níveis de etanol e água. O cálculo do consumo foi feito através da razão entre gramas de etanol consumido por quilograma do peso do animal (fórmula 1) e, para o cálculo da porcentagem da preferência pelo etanol (%Pe), utilizou-se a razão entre o volume (ml) do consumo de etanol pelo volume (ml) do total de líquidos consumidos (etanol + água) (fórmula 2) (CARNICELLA; RON; BARAK, 2014).

Esse protocolo permitiu a adaptação do animal ao sabor e ao consumo de etanol, a comparação do consumo dessa substância antes, durante e após os ciclos de intoxicação na câmara de vapor de etanol, assim como, a comparação entre o consumo dessa substância em animais adolescentes sob a condição de estresse do isolamento social (CARNICELLA; RON; BARAK, 2014; KIMBROUGH et al., 2017) e os animais controles. Para reduzir o vazamento, as garrafas foram equipadas com tubos de aço inoxidável com duas válvulas esféricas. A quantidade de etanol consumida por cada camundongo foi medida pesando as garrafas antes e depois de cada sessão, e os resultados foram normalizados utilizando duas garrafas idênticas (garrafas controle de vazamento) cada uma contendo as mesmas soluções de reforço oferecidas e colocadas em uma gaiola vazia pelo mesmo período dos grupos experimentais.

(1) Fórmula do consumo:

$$C(g/kg) = \frac{\frac{(Consumo\ final - Consumo\ inicial) * 10}{100} * 0,789}{Peso} * 1000$$

(2) Fórmula da Preferência:

$$\%Pe = \frac{Volume\ de\ etanol}{(Volume\ de\ etanol + Volume\ de\ água)} * 100$$

4.8 INTOXICAÇÃO PELA EXPOSIÇÃO À CÂMARA DE VAPOR DE ETANOL

Os animais foram expostos cronicamente à câmara de vapor de etanol na tentativa de induzir através de ciclos de intoxicação e abstinência, comportamentos similares ao observado em humanos dependentes, como por exemplo, a presença de sinais de abstinência, tolerância e sintomas emocionais negativos após a cessação da exposição ao vapor de etanol (BIANCHI et al., 2021; KIMBROUGH et al., 2017). Além disso, em comparação com outros métodos, a inalação de vapor de etanol oferece vantagens como a manutenção de BECs consistentes, impede a evasão da aversão natural dos roedores ao consumo de etanol e diminui a possível influência da manipulação entre pesquisador-roedor para os testes comportamentais que foram realizados na sequência (BIANCHI et al., 2021; GILPIN et al., 2008).

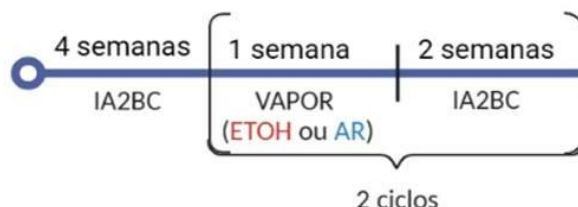
O protocolo utilizado para a realização deste experimento foi adaptado de (LI et al., 2007; GILPIN e KOOB, 2008; GILPIN et al., 2009).

Os animais permaneceram dentro da caixa moradia e essas foram inseridas dentro das caixas acrílicas acopladas ao sistema de vapor de etanol por todo o período experimental. O vapor de etanol foi produzido pelo gotejamento de etanol 95% em um frasco térmico de 2L mantido a 508°C em uma manta de aquecimento diariamente. O oxigênio foi ejetado por um compressor para o fundo do frasco a uma taxa de 11L/min para misturar-se com etanol. As concentrações de etanol variaram entre 6mg/L a 8mg/L. A exposição ao vapor de etanol foi controlada utilizando válvulas de fluxo de ar para manter a concentração sanguínea de etanol constante e capaz de induzir a dependência sem colocar em risco a vida e saúde dos animais. A intenção do uso da câmara de vapor foi manter a etanolemia entre 150 e 250mg/dl. Para determinação da concentração sanguínea de etanol, foi coletado sangue da veia submandibular e esses foram armazenados em tubos plásticos para posterior análise da alcoolemia por cromatografia gasosa (CG). A exposição ao etanol foi realizada diariamente por 16h, seguidas de 8h de abstinência. Os animais controles não foram expostos ao vapor de etanol e não foram submetidos ao procedimento de coleta de sangue.

No delineamento do experimento 2 (4.2; figura 21) o ciclo da câmara de vapor de etanol foi realizado de forma intermitente, sendo intercalado com duas semanas de consumo de etanol através do protocolo de IA2BC (3.7) e esse ciclo foi repetido por duas vezes. O experimento

cíclico foi realizado com o objetivo de avaliar se os ciclos de intoxicação podem promover aumento no consumo voluntário do ETOH.

Figura 21. Representação esquemática do ciclo de exposição ao etanol (câmara de vapor + IA2BC) do experimento 2 (descrito em 4.2).



Fonte 22. Desenho esquemático feito pela autora.

No delineamento do experimento 3 (4.3; figura 22) o protocolo da câmara de vapor foi realizado ao final da quarta semana do protocolo de IA2BC (3.7) e estendido por duas semanas consecutivas com o objetivo de intensificar os ciclos de intoxicação (16h de vapor) e abstinência (8h de oxigênio). Ao final da segunda semana da exposição ao vapor, os animais passaram novamente pelo protocolo do IA2BC, entretanto, este foi realizado por apenas uma semana. O experimento 3 teve como objetivo avaliar o efeito da intoxicação crônica ao ETOH promovida pelos dois ciclos consecutivos à câmara de vapor.

Figura 22. Representação esquemática do ciclo de exposição ao etanol (câmara de vapor + IA2BC) do experimento 3 (descrito em 4.3).



Fonte 23. Desenho esquemático feito pela autora.

4.9 PROTOCOLO DE EXERCÍCIO FÍSICO DE INTENSIDADE MODERADA

Todos os animais foram adaptados à esteira de corrida para camundongos durante uma semana e, durante esse período, os animais caminharam diariamente na esteira a uma velocidade entre 5-10m/min, durante 10-20 minutos. Não foi utilizada estimulação elétrica durante o período de adaptação e treinamento.

Após o período de adaptação, os animais realizaram, individualmente, o teste de esforço máximo (TEM), que consistiu em corrida na esteira com incremento de 3m/min a cada 3 minutos e teve como objetivo avaliar o desempenho dos animais através da comparação entre os valores das velocidades antes (inicial- TEM1) e depois (final- TEM2) das 4 semanas de treinamento. Esse teste foi interrompido ao constatar a exaustão dos animais, ou seja, quando foi observado que mesmo após receber estímulo manual, os animais não conseguiam voltar a correr. Após o TEM 1, os animais foram aleatoriamente alocados em dois grupos distintos: sedentário e treinado, garantindo que ambos os grupos de animais possuísem a mesma capacidade física média antes do início do protocolo de treinamento.

Para o treinamento físico de intensidade moderada foi utilizado 60% do valor da média da velocidade obtida no TEM1 e os animais correram 1 hora /dia, durante 5 dias na semana por um período de 4 semanas.

O TEM foi repetido ao final da 4ª semana de treinamento. O TEM 2 teve como objetivo avaliar a eficácia do protocolo de treinamento utilizado no desempenho dos animais. O protocolo de treinamento utilizado foi adaptado de (POOLE et al., 2020; REYNOLDS; LEE, 2020) e todo o treinamento foi realizado no período do ciclo claro de luz.

4.10 ANÁLISE DE RT-PCR

Para a análise de expressão gênica, utilizou-se a técnica de RT-PCR (Transcriptase reversa seguida pela reação em cadeia da polimerase; sigla do inglês: *Real Time Reverse transcription polymerase chain reaction*). Após 24 horas do final do protocolo de exercício físico os animais foram eutanasiados através da decapitação e seus encéfalos coletados em nitrogênio líquido. Posteriormente, os encéfalos foram seccionados no criostato, sob temperatura de -19 a - 23°C, seguindo as coordenadas do atlas para camundongos de (PAXINOS; FRANKLIN, 2001). A região do hipocampo foi dissecada por meio de agulhas de ponta chata de 18 - 20 gauge e colocada em criotubos. Os tubos foram congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer a -80°C, para posterior análise da expressão gênica por RT-PCR.

A extração do RNA mensageiro foi realizada utilizando-se o Kit PicoPure RNA isolation (Cellco®), de acordo com as recomendações do fabricante. Em seguida, fitas simples de cDNA foram sintetizadas com o Kit cDNA Synthesis Kit with RNase Inhibitor (Cellco®), seguindo as orientações do fabricante. As amostras foram colocadas no termociclador (Applied Biosystems®) e ao término do procedimento o cDNA sintetizado foi armazenado a - 20°C.

Posteriormente, o ensaio de RT-PCR foi realizado em duplicata utilizando-se as amostras de cDNA; uma sonda específica para cada gene alvo (marcada com Fam; CRF - hormônio liberador de corticotrofina; CRF-BP - proteína de ligação de hormônio liberador de corticotrofina, CRF1- receptor de CRF do tipo 1); uma sonda para o gene controle (GAPDH), marcada com Vic; além do kit TaqMan Advanced Fast PCR Master Mix (Life Technologies®). Ao final, as misturas foram pipetadas em placas de 96 wells, para o processo de amplificação, no equipamento para PCR em tempo real, Applied Biosystem 7500 Real-Time PCR System. Os resultados de amplificação gênica foram normalizados em relação aos resultados do gene controle GAPDH. A análise da expressão gênica foi semiquantitativa $2^{-\Delta\Delta CT}$ (método delta delta CT), como descrito por (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

4.11 IMUNOFLUORESCÊNCIA PARA CÉLULAS DA GLIA (MICRÓGLIA: IBA-1 E ASTRÓCITO: GFAP)

Após dois dias do final do protocolo de exercício físico os animais foram eutanasiados com uma solução anestésica (combinado de acepromazina 2,0mg/kg, fentanil 0,02mg/kg, cetamina 100mg/kg e xilazina: 10mg/kg i.p), perfundidos com tampão fosfato de sódio 0,1M e paraformaldeído 4% e os encéfalos dos animais foram coletados. Posteriormente, os encéfalos foram seccionados em fatias com 40µm de espessura seguindo-se as coordenadas estereotáticas para camundongos do atlas de Paxinos e Franklin (2001) para camundongos (PAXINOS; FRANKLIN, 2001) e armazenadas em solução anticongelante (Sacarose 3% e tampão fosfato 0,05M) a -80°C. Para a realização da técnica de imunofluorescência, as fatias coronais do hipocampo foram lavadas com tampão Tris (TBS), permeabilizadas com Triton X-100 0,2%, lavadas novamente por mais três vezes e incubadas com os anticorpos primários anti-IBA-1 (E4O4W na diluição 1:500) e anti-GFAP (3670, na diluição 1:500), ambos da Cell signaling®, por 48h horas a 4°C.

Os cortes foram lavados mais três vezes com TBS e as fatias foram incubadas por 2 horas a temperatura ambiente com os anticorpos secundários (AlexaFluor 488, anti-coelho, produzido em macaco - diluição 1:200, Invitrogen®, Carlsbad, CA, EUA e AlexaFluor 568, anti-camundongo, produzido em cabra - diluição 1:200, Invitrogen®, Carlsbad, CA, EUA). Enfim, as fatias foram lavadas e montadas em laminas gelatinizadas e cobertas com lamínulas. Os cortes dos tecidos foram fotografados usando uma câmera acoplada a um microscópio de fluorescência e as células marcadas com o fluorocromo foram contadas com auxílio do programa Image J® e QuPath®.

Os parâmetros “sigma” (utilizado para suavizar a imagem) e “Threshold” (usado para delimitar as células), foram testados para cada região (CA1 ou DG) e padronizados de acordo com a marcação (IBA ou GFAP ou DAPI), como representados na tabela 2.

Tabela 2. Tabela da descrição dos parâmetros utilizados para as contagens das células da glia.

Marcação	Sigma	Threshold	Cell expansion
CA1-IBA	5	5	2 µm
CA1-DAPI	2	10	1µm
CA1-GFAP	2	11	1µm
CA1-DAPI	3	20	1µm
CG-IBA	5	5	1µm
CG -DAPI	1.5	10	1µm
CG -GFAP	5	7	1µm
CG -DAPI	2	20	1µm

Fonte 24. Criado no Word pela própria autora.

4.12 WESTERN BLOTING PARA LC3-I, p62, m-TOR (total e fosforilada) e BDNF

Após 24 horas do final do protocolo de exercício físico os animais foram eutanasiados através de decapitação, com auxílio de uma guilhotina e seguiu-se com a coleta de seus encéfalos em isopentano banhado no gelo seco. Após o congelamento rápido, os encéfalos foram acondicionados em folhas de papel alumínio e mantidos no gelo seco até serem estocados no freezer a -80°C. Os encéfalos foram seccionados no criostato, sob temperatura de -19 a -23°C, seguindo as coordenadas do atlas para camundongos de Paxinos e Franklin (2001) (PAXINOS; FRANKLIN, 2001). A região do hipocampo foi dissecada por meio de agulhas de ponta chata de 18-20 gauge e colocada em tubos criogênicos. Os tubos foram congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer a -80°C, para posterior quantificação de proteínas pela técnica de Western blotting, o qual foi realizado para o estudo da expressão de proteínas relacionadas ao fluxo autofágico e plasticidade neuronal.

A região seccionada foi preparada com o tampão de lise RIPA com adição de 1% SDS (150mM NaCl; 1% NP-40; 0,5% ácido deoxicólico; 1% SDS (dodecil sulfato de sódio; silga do inglês: *sodium dodecyl sulfat*e); 50mM Tris, pH 8,0; 2mM MgCl₂), suplementado com um coquetel de inibidores de proteases (protease inhibitor cocktail - 1:100 e 1mM PMSF) e

fosfatases (10mM NaF, 1mM Na₂MoO₄ e 1mM Na₃VO₄), no qual foram sonicadas no ultrassom, por 2 ciclos de 30 segundos cada. O sobrenadante foi coletado e a concentração proteica foi determinada pelo método de Bradford. As proteínas totais foram preparadas em tampão de amostra contendo 150 mM Tris, 20% glicerol, 4% SDS e 0,01% azul de bromofenol, pH 6,8. Em seguida as amostras foram aquecidas a 95°C por 10 minutos para desnaturação proteica.

As proteínas (15-30µg) foram aplicadas em gel de poliacrilamida, com densidade que variou entre 8 e 15%. A separação das proteínas foi realizada por eletroforese em tampão de corrida (25mM Tris, 192mM glicina, 0,1% SDS), seguido pela transferência para a membrana de nitrocelulose ou de PVDF (Polyvinylidene difluoride - EMD Millipore Corporation) (400 mA, 1 hora), utilizando o tampão de transferência (25mM Tris, 192mM glicina e 20% metanol). O bloqueio de sítios inespecíficos foi realizado em solução de leite em pó desnatado 5% em PBS-T ou TBS-T (10mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 0,01% Tween-20) por 2 horas, a temperatura ambiente.

Ao final do bloqueio, as membranas foram lavadas e incubadas overnight a 4°C com os anticorpos primários monoclonais ou policlonais para a avaliação do fluxo autofágico e plasticidade neuronal: anti-LC3- I e II (1:2000, #2775S, Cell Signaling Technology®); anti-SQSTM1/p62 (1:2000, #PM045; Medical and Biological Laboratories®); anti-phospho-mTORC (serina 2448, 1:1000, #2971, Cell Signaling Technology®); anti-t-mTORC (1:1000, #9464, Cell Signaling Technology®); anti-BDNF (1:1000, #60071, Cell Signaling Technology®). Para cada experimento realizado foi utilizado o controle endógeno: anticorpo monoclonal de camundongo anti-GAPDH (1: 5000, #G8795) adquiridos da Sigma-Aldrich®.

Após o período de incubação dos anticorpos primários, as membranas foram lavadas e incubadas com o anticorpo secundário contra IgG de coelho ou de camundongo conjugado a peroxidase HRP (horsearedish peroxidase, Jackson Immunoresearch - 1:5000) em solução de PBS-T ou TBS-T com leite em pó desnatado 2%, por 2 horas em temperatura ambiente. Em seguida as membranas foram lavadas e a ligação específica foi visualizada usando um sistema de quimioluminescência (Western Lightning Plus-ECL, Perkin Elmer). Os sinais foram detectados por um fotodocumentador digital (Uvitec®) e analisados densitometricamente pelo Uvitec Alliance software. Toda a densidade óptica das bandas foi normalizada com as bandas de GAPDH correspondentes em cada experimento. Os valores foram expressos em média a qual foi comparada entre os grupos.

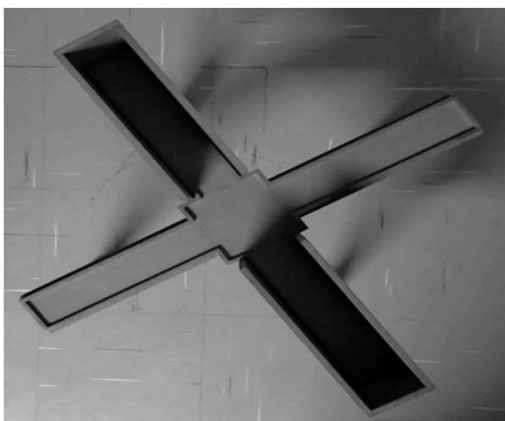
4.13 LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO (LCE)

Para avaliação do comportamento semelhante à ansiedade, os camundongos foram introduzidos individualmente em um aparato em forma de cruz (LISTER, 1986; FRASER et al., 2010) elevado 54cm do solo, por 5min. Esse aparato, representado na figura 23, consiste em dois braços abertos opostos (com uma elevação entre 0,5 - 1cm nas bordas finais) e dois braços fechados (com paredes de 10cm) opostos do mesmo tamanho (27cm cada) e uma região central quadrada (11cm). O aparato foi devidamente higienizado com ETOH 20% após o teste de cada animal. Os comportamentos dos camundongos foram registrados e analisados com um software de rastreamento de imagem (Any-Maze®, Reino Unido).

Os seguintes parâmetros espaço-temporais foram analisados: número de entradas nos braços abertos (LCEeba), fechados (LCEebf) e terço final (LCEetf); tempo total de permanência nos braços abertos (LCetba), fechados (LCetbf) e terço final (LCetf). A partir desses dados, calculou-se a frequência do número de entrada nos braços abertos (%LCEeba) e a frequência do tempo de entrada nos braços abertos (%LCetba), respectivamente a partir da fórmula 3 e 4 abaixo. Os resultados dos testes %LCEeba, %LCetba, LCEebf e LCEetf estão apresentados no item 4.3 e os demais testes se encontram nos materiais suplementares do experimento 3.

Também foram analisados outros parâmetros complementares referentes à avaliação de risco, como: número de mergulho desprotegido (LCEnmd; movimento exploratório na região desprotegida, na qual o camundongo direciona seu olhar e focinho para o solo); número de mergulho protegido (LCEnmp semelhante ao anterior, entretanto, é realizado na plataforma central); número de esticada desprotegida (LCEned; postura exploratória realizada em braços abertos, na qual o animal estica seu corpo para frente, mantendo as patas traseiras fixas e então retorna à posição inicial); número de esticada protegida (LCEnep; semelhante ao parâmetro anterior, porém, são realizados nos braços fechados ou plataforma central). Esses resultados também se encontram nos materiais suplementares do experimento 3.

Figura 23. Aparato para realização do teste LCE. Este aparato é construído em forma de cruz, elevado 54 cm do solo e consiste em dois braços abertos opostos e dois braços fechados opostos do mesmo tamanho.



Fonte 25. Fotografia tirada pela própria autora, através do software Any-Maze®.

(3) Fórmula da %LCEeba:

$$\%LCEeba = \frac{(\text{Número de entrada no braço aberto})}{\text{Número de entrada total}} \times 100$$

(4) Fórmula da %LCEtba:

$$\%LCEtba = \frac{(\text{Tempo de entrada no braço aberto})}{344} \times 100$$

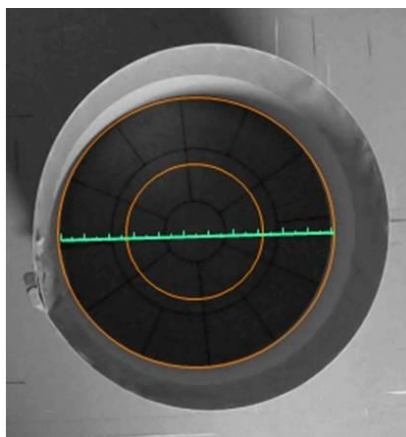
4.14 CAMPO ABERTO (CA)

Os camundongos foram colocados individualmente em um aparato que consiste em uma arena feita de madeira no formato circular (40cm de diâmetro), cercada por paredes com 60cm de altura, por 10min (600s), representado pela imagem 24. O aparato foi devidamente higienizado com ETOH 20% após o teste de cada animal. Os comportamentos foram registrados e analisados com um software de rastreamento de imagem (Any-Maze®, Reino Unido). Esse mesmo aparato também foi utilizado para o teste do reconhecimento de objetos, portanto, utilizamos esse teste de exposição ao aparato de campo aberto como uma sessão de habituação ao aparato para o teste de reconhecimento de objeto (KRAEUTER; GUEST; SARNYAI, 2019; SEIBENHENER; WOOTEN, 2015).

Foram avaliados o tempo (s) de permanência na zona central (CAzc) e o tempo (s) de permanência na zona periférica (CAzp) da arena, apresentados nos materiais suplementares do

experimento 3. A partir desses dados foi calculado a frequência de permanência na zona central (%CA_{tzc}), através da fórmula 5 abaixo, e este resultado foi apresentado no item 4.3.

Figura 24. Aparato para realização do teste CA. Este aparato é construído em forma cilíndrica, e consiste em duas zonas: a zona central e a zona periférica.



Fonte 26. Fotografia tirada pela própria autora, através do software Any-Maze®.

(5) Fórmula da frequência de permanência na zona central:

$$\%CA_{tzc} = \frac{\text{tempo explorando a zona central}}{600} * 100$$

4.15 TESTE DO RECONHECIMENTO DO OBJETO NOVO (NORT)

O aparato consiste em uma arena feita de madeira no formato circular (40cm de diâmetro), cercada por paredes com 60cm de altura.

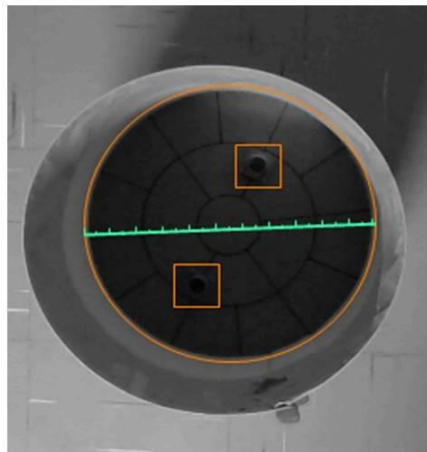
Esse teste é utilizado para testar diferentes fases de aprendizagem e memória em roedores e baseia-se na preferência nata dos animais por explorar um tempo maior as novidades (objeto novo/desconhecido) em comparação a algo familiar (objeto antigo/conhecido). Embora diversos outros fatores possam ser associados à uma menor exploração dos objetos, usualmente, relaciona-se a diminuição no tempo de exploração do objeto novo aos danos nos processos de aprendizagem ou nas etapas de formação de memória (LEGER et al., 2013).

Para avaliar a memória de reconhecimento de objetos o experimento foi realizado em três etapas: (1) os camundongos foram colocados individualmente em uma arena redonda de

campo aberto por 5min na presença de dois objetos idênticos denominados A1 e A2; (2) o objeto A2 foi trocado por um novo objeto, com características diferentes, denominado objeto B e, após 1 hora do final da primeira etapa, os animais foram colocados na arena para livre exploração dos objetos A1 e B por 5min; (3) o objeto B foi trocado por um novo objeto, com características diferentes, denominado objeto C e, após 24 horas do final da segunda etapa, os animais foram colocados na arena para livre exploração dos objetos A1 e C por 5min. A imagem 25 ilustra o aparato com os objetos localizados em seu interior. Foi considerado como exploração a aproximação do focinho do animal ao objeto.

O aparato foi devidamente higienizado com etanol 20% entre os testes de cada animal. Os comportamentos de exploração dos objetos foram registrados e analisados através de um software de rastreamento de imagem (Any-Maze®, Reino Unido). Foram avaliados o tempo total de exploração em cada objeto no treino, teste de 1h e 24h, e os resultados estão apresentados no item 4.3. Também foi calculado a porcentagem do tempo de exploração (%TE) do objeto novo (fórmula 6), sendo os valores acima de 50% indicadores de maior exploração do objeto novo, apresentados nos materiais complementares do experimento 3 (DENNINGER; SMITH; KIRBY, 2018).

Figura 25. Aparato para realização do teste NORT. Este aparato é construído em forma cilíndrica e possui dois objetos inseridos em seu interior. A exploração aos objetos é livre.



Fonte 27. Fotografia tirada pela própria autora, através do software Any-Maze®.

(6) Fórmula da porcentagem do tempo de exploração do objeto novo:

$$\%TE = \frac{\text{tempo explorando o obj novo}}{\text{tempo explorando (obj novo + obj familiar)}} * 100$$

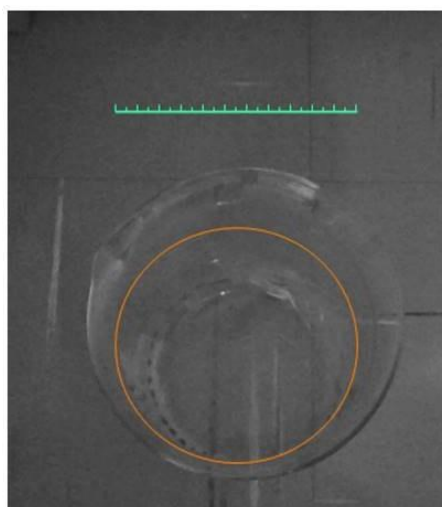
4.16 SPLASH DE SACAROSE

O *grooming* é um padrão de movimento nato do animal relacionado à manutenção da higiene e de outras funções fisiológicas. Para avaliar o comportamento de *grooming* associado ao autocuidado/autolimpeza, mensura-se o tempo que o animal permanece realizando esses movimentos. Alterações no padrão e no tempo total desses movimentos podem ser indicativos de alterações nas funções fisiológicas, como por exemplo, uma diminuição no tempo de *grooming* pode estar associado ao surgimento de um estado apático, assim como um aumento no tempo e no padrão de realização desse comportamento podem estar associados ao surgimento de um comportamento tipo ansioso.

Os camundongos foram colocados individualmente em um béquer vazio e transparente de 2 litros, como ilustrado na figura 26. Em seguida, uma solução de sacarose a 10% foi borrifada três vezes nas pelagens dorsais dos animais usando uma garrafa com *spray*.

O comportamento dos camundongos foi registrado por 5min e analisado posteriormente pelo experimentador para quantificar o parâmetro de tempo total de limpeza no dorso (Gtd) e tempo de latência para iniciar o *grooming* (Glat), resultados apresentados no item 4.3 (KALUEFF et al., 2016b; SPRUIJT; VAN HOOFF; GISPEN, 1992).

Figura 26. Aparato para realização do teste de splash de sacarose. Este aparato é construído em forma cilíndrica e o animal permanece em seu interior, onde pode realizar os movimentos de *grooming* livremente.



Fonte 28. Fotografia tirada pela própria autora, através do software Any-Maze®.

4.17 ROTAROD (RR)

O aparelho RotaRod foi fabricado pela empresa Bonther® S/A (Ribeirão Preto-SP) e consiste em uma barra giratória com 3cm de diâmetro, devidamente resinada para fornecer aderência, dividida em cinco compartimentos iguais. Cada compartimento possui temporizadores no solo que medem a latência e o número de quedas dos animais.

O teste do RotaRod é utilizado para acessar a coordenação motora e o equilíbrio dos animais, uma vez que eles devem permanecer equilibrados no cilindro em movimento rotatório, sendo que o aumento no número de quedas pode estar associado a prejuízos nas funções motoras. Os camundongos foram colocados sob o cilindro rotatório do equipamento de RotaRod®, ilustrado na figura 27 e foram habituadas as diferentes velocidades de giro utilizadas no protocolo (16rpm, 25rpm, 37rpm). No dia seguinte à habituação iniciou-se o teste com duração de 3 minutos com todos os animais, em três velocidades diferentes 16rpm, 25rpm e 37rpm. Todos os animais completaram o teste em uma única velocidade e, após 30min, realizaram o teste na velocidade seguinte. Foi registrado o parâmetro número total de quedas (RRnq) (DEACON, 2013; ELTOKHI; KURPIERS; PITZER, 2021; SHIOTSUKI et al., 2010).

Figura 27. Aparato para realização do teste de RotaRod. Este aparato é construído em um cilindro rotatório no qual o animal deve se equilibrar em cima.



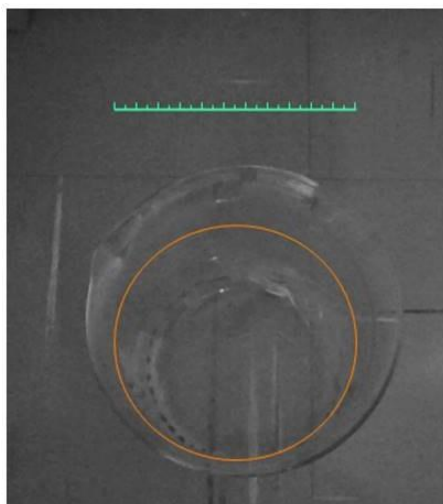
Fonte 29. Fotografia tirada pela própria autora.

4.18 NADO FORÇADO (NF)

Para avaliar o comportamento semelhante ao transtorno de humor tipo depressivo, os camundongos foram colocados individualmente em um recipiente cúbico de vidro de 4 litros, preenchido com água a temperatura entre 23-25°C na quantidade suficiente para que nem as patas traseiras nem a cauda dos animais tocassem o fundo, assim como ilustrado na figura 28.

O comportamento de nado e de imobilidade dos camundongos foram registrados por 6min, sendo descartados os 2 primeiros minutos e avaliados os 4 últimos minutos para a quantificação dos parâmetros de tempo(s) total de nado (NFn) e tempo(s) total de imobilidade (NFi) (CAN et al., 2012).

Figura 28. Aparato para realização do teste de nado forçado e mensuração do tempo de nado e imobilidade. Este aparato é construído em forma cilíndrica e o animal permanece em seu interior, o qual é preenchido de água.



Fonte 30. Fotografia tirada pela própria autora, através do software Any-Maze®.

4.19 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

4.19.1 Experimento 1:

Os dados de foram analisados por meio de Equações de Estimação Generalizadas (GEE), considerando-se como variáveis dependentes: o peso (g) e a velocidade (m/s); como variáveis independentes: o tempo (semanas dos ciclos), tratamento (salina, etanol), e/ou grupo (exercício, sedentário). Foram testadas diferentes distribuições para o modelo, dependendo do tipo da variável dependente (contínua ou discreta). Adotou-se aquele que apresentou o menor valor do critério de informação de Akaike (AIC) e distribuição dos resíduos normais (Q-Q plot e teste de normalidade). O teste post-hoc de Bonferroni foi utilizado quando os fatores principais apresentaram diferença. As médias do consumo foram expressas em média $\pm$ erro padrão.

Os dados dos experimentos do estudo transversal, como as análises moleculares da expressão dos genes ($2^{-\Delta\Delta CT}$) foram realizados por meio de Modelos Lineares Generalizados (GLzM), considerando-se como variáveis dependentes a expressão dos seguintes genes: CRF,

CRF1 e CRF-BP e como variáveis independentes a administração IP (água e etanol) e o treinamento (exercício e sedentário). Foram testadas diferentes distribuições para o modelo e adotamos aquele que apresentou o menor valor do critério de informação de Akaike (AIC) e distribuição dos resíduos normais (Q-Q plot).

Todas as análises foram realizadas com o auxílio do *software* Jamovi (versão 2.3.28) e os gráficos foram feitos no *software* Graphpad Prism (versão 8.0.2). Foi considerado $p < 0,05$ como significativo em todas as análises.

4.19.2 Experimento 2:

Os dados dos estudos longitudinais foram analisados por meio de Equações de Estimção Generalizadas (GEE), considerando-se como variáveis dependentes: o consumo (g/kg), o peso (g), a preferência por ETOH (%) e a velocidade (m/s); como variáveis independentes: o tempo (semanas), tratamento (vapor, ar), e/ou grupo (exercício, sedentário). Foram testadas diferentes distribuições para o modelo, dependendo do tipo da variável dependente (contínua ou discreta). Adotou-se aquele que apresentou o menor valor do critério de informação de Akaike (AIC) e distribuição dos resíduos normais (Q-Q plot e teste de normalidade).

Para avaliar o consumo dos animais desde o início do protocolo foi realizado uma ANOVA de uma via para o consumo forçado e para a semana de habituação ao protocolo. Como variável dependente utilizamos o consumo de etanol (g/kg) e como variável independente utilizamos o grupo AR vs VAPOR. O teste post-hoc de Bonferroni foi utilizado quando os fatores principais apresentaram diferença. As médias do consumo foram expressas em média $\pm$ erro padrão.

Os dados dos experimentos do estudo transversal, como as análises moleculares das células da glia foram analisados por meio de Modelos Lineares Generalizados (GLZM), considerando-se como variáveis dependentes os números de células ($n^\circ/\mu\text{m}$): IBA-1 e GFAP; e como variáveis independentes o tratamento (água e etanol) e o treinamento (exercício e sedentário).

Todas as análises foram realizadas com o auxílio do *software* Jamovi (versão 2.3.28) e os gráficos foram feitos no *software* Graphpad Prism (versão 8.0.2). Foi considerado $p < 0,05$ como significativo em todas as análises.

4.19.3 Experimento 3:

Os dados dos experimentos de estudo longitudinal foram analisados por meio de Equações de Estimação Generalizadas (GEE), considerando-se como variáveis dependentes: o consumo (g/kg), o peso (g), a preferência por ETOH (%), velocidade (m/s) e a expressão de proteínas (μ g); como variáveis independentes: o tempo (semanas), tratamento (etanol, água), e/ou grupo (exercício, sedentário). Foram testadas diferentes distribuições para o modelo, dependendo do tipo da variável dependente (contínua ou discreta). Adotou-se aquele que apresentou o menor valor do critério de informação de Akaike (AIC) e distribuição dos resíduos normais (Q-Q plot e teste de normalidade). O teste post-hoc de Bonferroni foi utilizado quando os fatores principais apresentaram diferença. As médias do consumo foram expressas em média $\pm$ erro padrão.

Os dados dos experimentos do estudo transversal, como as análises moleculares e os comportamentos, foram analisados por meio de Modelos Lineares Generalizados (GLzM), considerando-se como variáveis dependentes a expressão das seguintes proteínas: LC3-I e II, p62, BDNF, p-mTOR e t-mTOR e de todos os parâmetros comportamentais apresentados no resultado 3: %LCEeba, LCEebf e %LCetba; %CATzc; ROte, RRnq; Glat, Gld; NFi e NFn e dos testes comportamentais apresentados no material suplementar: LCEeba, LCetba, LCetbf, LCettf, LCEnmd, LCEnmp, LCEned e LCEnep, CAzc, CAzp e %TE. As variáveis independentes foram: a homecage (agrupado e/ou isolado), consumo (água e etanol) e treinamento (exercício e sedentário). Foram testadas diferentes distribuições para o modelo e adotamos aquele que apresentou o menor valor do critério de informação de Akaike (AIC) e distribuição dos resíduos normais (Q-Q plot).

Todas as análises foram realizadas com o auxílio do *software* Jamovi (versão 2.3.28) e os gráficos foram feitos no *software* Graphpad Prism (versão 8.0.2). Foi considerado $p < 0,05$ como significativo em todas as análises.

5. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E RESULTADOS

No presente estudo, utilizamos três diferentes protocolos de intoxicação de etanol. No primeiro experimento, o etanol foi administrado intraperitonealmente (4.1); no segundo experimento foi associado o consumo intermitente de livre acesso a duas garrafas (IA2BC), sendo uma de etanol 10% e outra de água, com episódios cíclicos de exposição à câmara de vapor de etanol (4.2) e, no terceiro experimento, foi realizado o protocolo de consumo por

IA2BC seguido por um período de 2 semanas contínuas de exposição à câmara de vapor de ETOH (4.3).

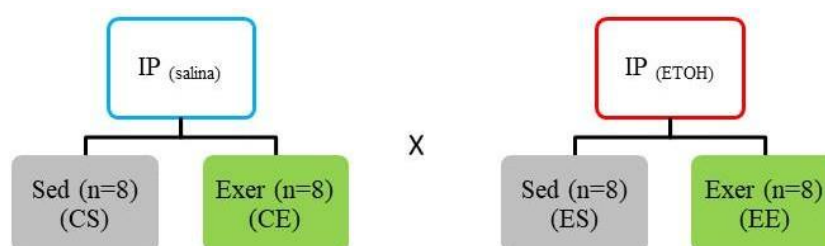
Após o final de cada protocolo de intoxicação ao etanol, os animais permaneceram 2 dias sem receber nenhum tipo de manipulação e foram então submetidos ou não ao protocolo de exercício físico (3.9). Durante o período de treinamento os animais não tiveram acesso ao etanol. Após o exercício físico seguiu-se com os testes comportamentais e moleculares, de acordo com os delineamentos descritos abaixo.

5.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL DO EXPERIMENTO 1:

“Investigação da participação do sistema CRFérgico (CRF, CRFr1 e CRF-BP) do hipocampo dorsal após a prática do exercício físico durante a abstinência protraída, nos animais adolescentes intoxicados e/ou não por etanol”.

Para a realização desse experimento, os animais foram divididos em quatro grupos experimentais, demonstrado na **figura 29**, de acordo com os tratamentos recebidos: injeção intraperitoneal de salina e sedentarismo (CS) (n=7), injeção intraperitoneal de salina e exercício (CE) (n=7), injeção intraperitoneal de etanol e sedentarismo (ES) (n=7) e injeção intraperitoneal de etanol e exercício (EE) (n=8).

Figura 29. Esquema dos quatro grupos experimentais, de acordo com os tratamentos recebidos: injeção intraperitoneal de salina e sedentarismo (CS), injeção intraperitoneal de salina e exercício (CE), injeção intraperitoneal de etanol e sedentarismo (ES) e injeção intraperitoneal de etanol e exercício (EE).



Fonte 31. Esquema feito pela própria autora.

A administração de etanol (2,5g/kg de etanol) ou salina foi feita de forma intraperitoneal nos animais durante três dias, seguidos de dois dias sem tratamento e, após os quatro ciclos de intoxicação, estes foram submetidos ao protocolo de exercício físico, como descrito anteriormente no item 3.9. A literatura considera as doses entre 2-3g de etanol puro/kg de peso

corporal para camundongos como dose moderada a alta e estas são tipicamente utilizadas para induzir intoxicação sem efeitos sedativos/hipnóticos (mensurados como perda do reflexo de retificação) (JEANBLANC et al., 2019).

Os animais foram pesados no primeiro dia de cada novo ciclo para reajuste do volume de etanol injetado. Foi realizado o acompanhamento dos valores do peso durante todo o protocolo experimental, tanto durante a intoxicação ao etanol quanto durante à prática do exercício físico e esses resultados encontram-se descritos no material suplementar do experimento 1.

Após 24 horas do final das sessões de exercício, os animais foram anestesiados e eutanasiados por decapitação, os encéfalos foram coletados, congelados e armazenados a -80°C. A região do hipocampo foi dissecada por meio de agulhas de ponta chata de 18 - 20 gauge e colocada em um criostato e submetidas a análise de RT-PCR (como descrito no item 3.10), como ilustrado na **figura 30**.

Figura 30. Delineamento experimental 1: administração de etanol ou salina realizada de forma intraperitoneal. Foram realizados 4 ciclos sendo cada um deles composto de três dias consecutivos de injeção, seguidos de dois dias sem administração de substância.



Fonte 32. Esquema feito pela própria autora utilizando o programa BioRender Templates®.

5.2 RESULTADOS DO EXPERIMENTO 1:

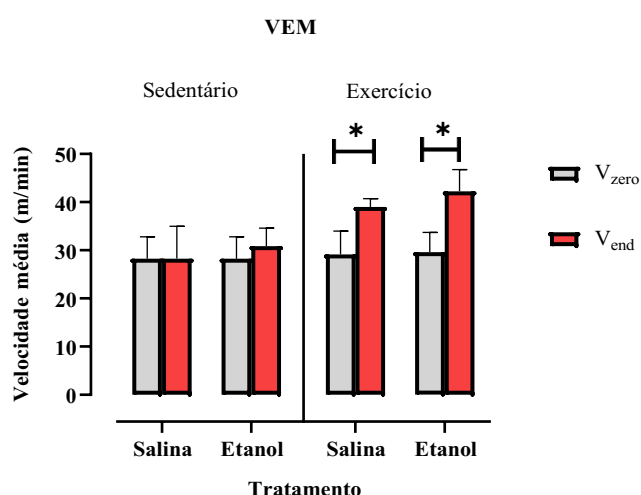
ETAPA 1: Avaliação da capacidade cardiovascular obtida antes e depois do protocolo de exercício físico, a partir dos valores da velocidade média máxima, entre os diferentes tratamentos (etanol x salina); grupos (sedentários x exercitados).

5.2.1: Velocidade média:

Para avaliar o efeito do exercício físico foi realizado o teste de esforço de antes e depois em todos os animais do experimento. Foi realizado o teste de GEE sendo que a distribuição que melhor aderiu aos dados foi a Poisson, com $AIC = 359,26$.

Os resultados mostraram que houve efeito do tempo [$X^2(1) = 15,13$, $p < 0,001$], do treinamento [$X^2(1) = 14,25$, $p < 0,001$] e da interação tempo*treinamento [$X^2(1) = 8,80$, $p = 0,003$]. Para o tempo, observamos que após o treinamento a velocidade dos animais foi maior ($\beta = 0,832$ $p < 0,001$) [Antes: $28,8 \pm 0,99$ m/s; Depois: $34,6 \pm 1,1$]. Além disso, o grupo exposto ao exercício físico apresentou uma velocidade maior do que o grupo sedentário ($\beta = 1,19$ $p < 0,001$) [Exercício: $34,5 \pm 1,08$ m/s; Sedentário: $28,9 \pm 1,02$]. A interação mostrou que os animais que passaram pelo exercício físico tiveram velocidade final maior em comparação a velocidade final dos sedentários ($\beta = 1,37$ $p < 0,001$) [Exercício Antes: $29,4 \pm 1,40$ m/s; Exercício Depois: $40,6 \pm 1,65$ m/s; Sedentário Antes: $28,3 \pm 1,42$ m/s; Sedentário Depois $29,5 \pm 1,45$ m/s].

Figura 31. Avaliação do efeito do treinamento, na velocidade média, durante o protocolo de exercício físico na esteira. Foi observado efeito do treinamento (sedentário x exercício), tempo (início e final) e interação entre eles. * Aumento na velocidade final dos animais do grupo exercitado em relação aos sedentários, ao longo do tempo, independente do tratamento.

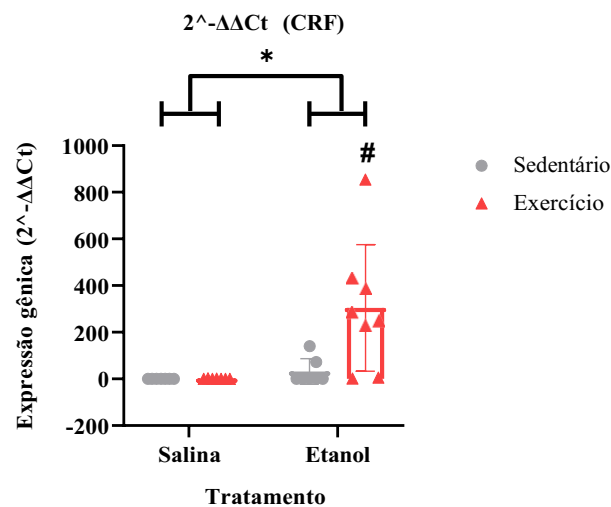


Esses resultados indicam que os animais que passaram pelo exercício físico aumentaram a velocidade no último teste de esforço (Bonferroni $p < 0,001$) enquanto para os animais sedentários não houve diferença na velocidade inicial e final (Bonferroni $p = 1,000$). Isso é um indicativo de que o exercício físico melhorou o desempenho dos animais, promovendo aumento na capacidade física, o que foi observado através do aumento na velocidade desses animais

ETAPA 2: Verificar as alterações nas expressões dos genes CRF, CRF-R1 e CRF-BP entre os quatro grupos experimentais, comparando o efeito dos tratamentos: intoxicação de etanol e exercício físico durante a abstinência protraída e as suas interações.

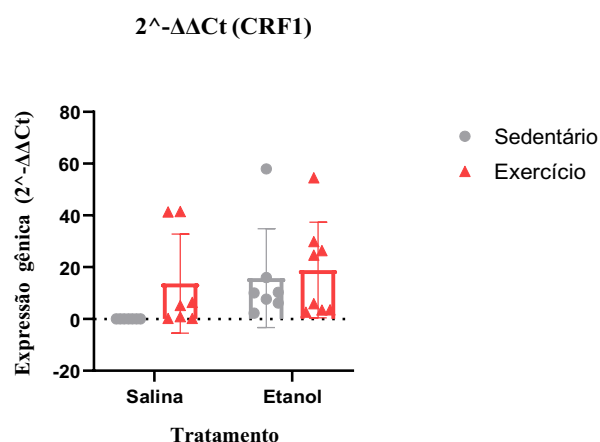
Em relação à expressão do gene CRF dos animais, a distribuição que melhor aderiu aos dados foi a Gamma, com AIC = 179,09. Os resultados mostraram que houve efeito do tratamento [$X^2(1) = 367,13$, $p < 0,001$] e do treinamento [$X^2(1) = 18,90$, $p = 0,001$], mas não houve interação entre os fatores [$X^2(1) = 0,254$, $p = 0,614$]. Analisando o fator tratamento observamos que o etanol aumentou o log da chance de os animais terem expressado mais esse gene em relação ao grupo salina (Etanol: $97,74 \pm 29,57$; Salina: $0,417 \pm 0,130$). Em relação ao fator treinamento, observamos que o exercício aumentou a chance de os animais expressarem mais esse gene em relação ao grupo sedentário (Exercício: $17,85 \pm 5,4$; Sedentário: $2,28 \pm 0,714$).

Figura 32. Avaliação da expressão gênica do CRF após os protocolos de intoxicação alcoólica por IP e exercício físico. Foi observado efeito do tratamento (salina/Ctr x etanol) e do treinamento (exercício x sedentário). * Etanol aumentou o log da chance de os animais expressarem mais esse gene em relação ao grupo salina. # Exercício aumentou o log da chance de os animais expressarem mais esse gene em relação ao grupo sedentário.



Em relação à expressão do gene CRF-R1 dos animais, a distribuição que melhor aderiu aos dados foi a Normal, com AIC = 271,36. Os resultados mostraram que não houve efeito do tratamento [$X^2(1) = 1,09$, $p < 0,296$], do treinamento [$X^2(1) = 1,13$, $p = 0,287$] e não houve interação entre os fatores [$X^2(1) = 1,71$, $p = 0,191$].

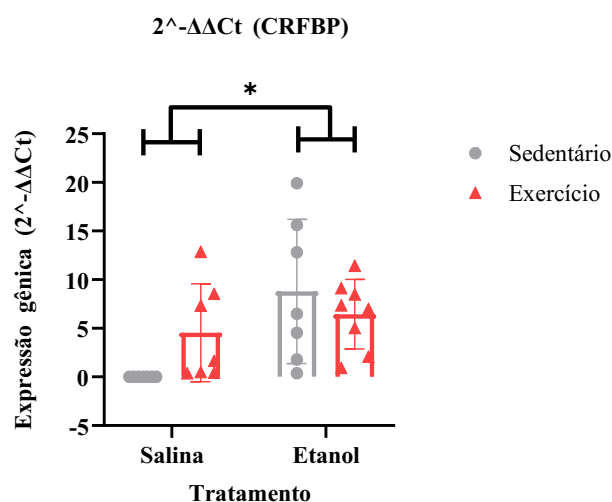
Figura 33. Avaliação da expressão gênica do CRF-R1 após os protocolos de intoxicação alcóolica por IP e exercício físico. Não foi observado efeito do tratamento (salina/ctr x etanol) nem do treinamento (exercício x sedentário).



Em relação à expressão do gene CRF-BP dos animais, a distribuição que melhor aderiu aos dados foi a Normal, com AIC = 178,72. Os resultados mostraram que houve efeito do tratamento [$X^2 (1) = 9,034$, $p < 0,003$], mas não houve efeito do treinamento [$X^2 (1) = 0,373$, $p = 0,541$] e da interação entre os fatores [$X^2 (1) = 3,74$, $p = 0,053$]. Em relação ao tratamento, observou-se que o etanol promoveu aumento na expressão do gene dessa proteína em relação ao grupo salina (Etanol: $7,61 \pm 1,24$; Salina: $2,26 \pm 1,28$).

Figura 34. Avaliação da expressão gênica do CRF-BP após os protocolos de intoxicação alcóolica por IP e exercício físico. Foi observado efeito do tratamento (salina/ctr x etanol) na expressão do gene dessa proteína.

*Aumento na expressão do gene dessa proteína no grupo ETOH em relação ao grupo salina.



Em conjunto, as análises dos resultados do CRF e CRF-BP nos mostram que o tratamento com etanol promoveu uma resposta adaptativa neste sistema, levando ao aumento

da indução desses genes durante a abstinência protraída, nos animais que receberam ETOH e fizeram o exercício físico.

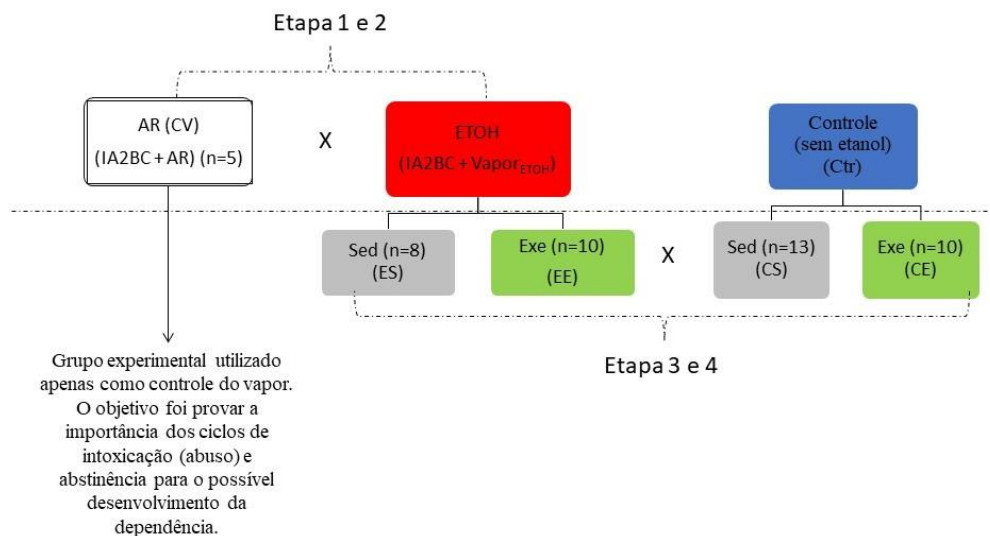
5.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL DO EXPERIMENTO 2

“Quantificação do consumo intermitente voluntário de livre escolha e caracterização quantitativa das células da Glia, após a prática e/ou não de exercício físico durante o período da abstinência protraída, nos animais que foram intoxicados ou não por etanol durante a adolescência”.

O objetivo deste experimento foi: (etapa 1): quantificar as alterações no padrão de consumo forçado de etanol antes do início do IA2BC; (etapa 2) quantificar as alterações no padrão de consumo voluntário de etanol antes, durante e após a exposição cíclica à câmara de vapor entre os animais que passaram pelos ciclos de intoxicação de etanol *versus* os animais que não passaram pela intoxicação; (etapa 3) avaliar o desempenho dos animais, através da velocidade máxima, antes e após o protocolo de exercício físico; (etapa 4) quantificar as alterações no padrão de consumo voluntário de etanol após o protocolo de exercício físico, entre os animais exercitados e sedentários; (etapa 5) quantificar alterações no padrão de expressão de células da glia, no hipocampo, após a intoxicação de etanol, à prática do exercício físico durante a abstinência protraída e na associação entre esses tratamentos.

Para a realização deste experimento os animais foram separados em cinco grupos experimentais, ilustrado pela figura 33: (1) controle vapor (CV; n=5), animais que passaram pelo protocolo de IA2BC e foram mantidos dentro das caixas acrílicas do sistema de vapor, durante o protocolo de câmara de vapor, sofrendo o mesmo estresse ambiental que os outros, porém recebendo somente oxigênio; (2) vapor de etanol sedentário (ES; n=10), animais que passaram pelo protocolo IA2BC e câmara de vapor, mas não passaram pelo protocolo de exercício físico; (3) vapor de etanol exercitado (EE; n=10), animais que passaram pelos protocolos IA2BC, câmara de vapor e exercício físico e (4) controle sedentário (CS; n=10), animais que não passaram por nenhum protocolo experimental; (5) controle exercício (CE; n=10) animais que não tiveram acesso ao etanol e passaram pelo protocolo de exercício físico, representados na **figura 35**.

Figura 35. Esquema dos cinco grupos experimentais, de acordo com os tratamentos recebidos: Ar x ETOH (vapor) e sedentário x exercitado: controle vapor (CV), etanol sedentário (ES), etanol exercitado (EE), controle sedentário (CS) e controle exercitado (CE).



Fonte 33. Esquema criado pela própria autora.

Os animais foram transferidos para o biotério de experimentação aos 21 dias de idade e durante uma semana (segunda, quarta e sexta) foi realizado o protocolo de consumo forçado de etanol (10% v/v) para habituação dos animais à substância (semana 1). Nos três dias especificados acima os animais permaneceram 4 horas tendo acesso apenas ao bebedouro de etanol, sem acesso a água. A partir da segunda semana (semana 2), aos 28 dias de idade, iniciou-se a habituação dos animais ao protocolo de IA2BC e esses tiveram livre acesso aos bebedouros de etanol e água, nos mesmos dias, durante 4 horas. Tanto os valores do consumo forçado quanto da habituação ao IA2BC foram registrados e utilizados para a comparação do padrão de consumo dos diferentes grupos (ar e vapor), entretanto esses valores não foram utilizados para comparação do consumo ao longo do tempo (semanas).

A partir da semana 3, utilizou-se a medida do consumo de líquidos, através da pesagem dos bebedouros e esse período foi denominado consumo basal 1. Os animais foram pesados semanalmente para o cálculo do volume de etanol consumido. Foi realizado o acompanhamento dos valores do peso durante todo o protocolo experimental, tanto durante o consumo e a intoxicação ao etanol, quanto durante à prática do exercício físico e esses resultados encontram-se descritos no material suplementar do experimento 2.

O protocolo de consumo voluntário de etanol foi realizado de forma intercalada ao protocolo de câmara de vapor, permitindo realizar a comparação entre o padrão de consumo dos animais adolescentes quando intoxicados (ES e EE) e/ou não (CV) pelo vapor de etanol. Após 48h do último ciclo de IA2BC (semana 8), iniciou-se o protocolo de exercício físico somente com os animais dos grupos CS, CE, ES e EE. A partir desse momento, como o objetivo foi avaliar o efeito do exercício físico (CE e EE) ou sedentarismo (CS e ES) durante o período de abstinência protraída, seguiu-se apenas com o grupo dos animais que passaram pela intoxicação ao etanol (ES e EE) e com os animais que não tiveram contato nenhum com o etanol (CS e CE). Ao final desse protocolo, apenas os animais que tiveram contato com etanol (ES e EE) passaram pelo protocolo de IA2BC para avaliar se o exercício físico poderia modificar o consumo desses animais. A **tabela 3** representa o experimento ao longo das semanas.

Após 24 horas do final da semana 8 os animais foram anestesiados e perfundidos, os encéfalos foram coletados, congelados e armazenados a -80°C. A região do hipocampo foi fatiada em um criostato e submetidas ao protocolo de imunofluorescência para investigação da participação das células gliais envolvidas nesse comportamento.

Tabela 3. Representação do protocolo experimental ao longo das semanas. Nas linhas estão representadas as semanas, nas colunas estão representados os dias e no cruzamento, qual foi o tratamento.

Fases	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6	Dia 7
Semana 1 (habituação)	Consumo Forçado	x	Consumo Forçado	x	Consumo Forçado	x	x
Semana 2 (Basal)	IA2BC	x	IA2BC	x	IA2BC	x	x
Semana 3 (Basal 1)	IA2BC	x	IA2BC	x	IA2BC	x	x
Ciclo 1	CÂMARA DE VAPOR					x	x
Semana 4	IA2BC	x	IA2BC	x	IA2BC	x	x
Semana 5	IA2BC	x	IA2BC	x	IA2BC	x	x
Ciclo 2	CÂMARA DE VAPOR					x	x
Semana 6	IA2BC	x	IA2BC	x	IA2BC	x	x
Semana 7	IA2BC	x	IA2BC	x	IA2BC	x	x
Exercício físico	Exercício					x	x
Exercício físico	Exercício					x	x
Exercício físico	Exercício					x	x
Exercício físico	Exercício					x	x
Semana 8	IA2BC	x	IA2BC	x	IA2BC	x	x

Fonte 34. Tabela criada pela própria autora.

5.4 RESULTADOS DO EXPERIMENTO 2:

Durante o período de intoxicação ao etanol pela câmara de vapor foram coletadas algumas amostras do sangue dos animais para acompanhar os valores da alcoolemia (entre 83 e 129 mg/dL). Esses resultados estão apresentados na tabela 4 abaixo.

Tabela 4. Valores sanguíneos da alcoolemia dos animais que passaram pelo protocolo de intoxicação ao etanol pela câmara de vapor e dos animais do grupo controle.

Grupo	Tratamento	Conc (g/L)	mg/dL
Caixa vapor 1	Semana 1	0,91	91
Caixa vapor 2	Semana 1	1,29	129
Caixa vapor 3	Semana 1	0,85	85
Caixa vapor 4	Semana 1	0,94	94
Caixa vapor 1	Semana 2	0,83	83
Caixa vapor 2	Semana 2	1,24	124
Caixa vapor 3	Semana 2	1,16	116
Caixa vapor 4	Semana 2	1,05	105
Controle	Exp 2- Ar	0,07	7
Controle	Exp 2- Ar	0,08	8
Controle	Exp 2- Ar	0,07	7
Controle	Exp 2- Ar	0,11	11

ETAPA 1: Comparação no consumo de ETOH entre os grupos, nas semanas iniciais (semana 1 e 2):

Os dados da ANOVA utilizados para avaliar a análise do consumo dos animais nas duas semanas iniciais do protocolo de consumo de ETOH encontram-se detalhados nos materiais suplementares do experimento 2.

Os resultados da semana 1 mostraram que durante o consumo forçado não houve efeito do grupo [$F(1) = 2,57$, $p=0,124$], indicando que tanto o grupo AR quanto o grupo VAPOR consumiam quantidade semelhante de etanol durante esta fase [Ar: $1,07 \pm 0,22$ g/kg; Vapor: $1,48 \pm 0,11$ g/kg]. Analisando a semana 2, considerada a semana de habituação ao protocolo IA2BC, a ANOVA de uma via também não mostrou diferença entre os grupos nem para o consumo de etanol [$F(1) = 3,63$, $p=0,070$], nem para o consumo de água [$F(1) = 0,45$, $p=0,507$].

Isso indica que os animais dos diferentes grupos consumiram quantidades semelhantes desses líquidos durante essa semana de habituação [Etanol (Ar: $1,65 \pm 0,34$ g/kg; Vapor: $2,40$

$\pm 0,18$ g/kg) Água (Ar: $21,78 \pm 5,35$ g/kg; Vapor: $25,87 \pm 2,82$ g/kg)]. Esses dados então indicados na figura 36.

ETAPA 2: Quantificação das alterações no padrão de consumo voluntário de etanol e água antes, durante e após a exposição cíclica à câmara de vapor, assim como a preferência pelo etanol e peso, entre os animais que passaram pelos ciclos de intoxicação de etanol versus os animais que não passaram pela intoxicação durante a adolescência.

Para avaliar o efeito da exposição à câmara de vapor no consumo de etanol, na figura 36, ao longo das semanas foi realizado o GEE sendo a distribuição Gamma a que melhor aderiu aos dados, apresentando um AIC=116,64. Os resultados mostraram que houve efeito do tempo [X^2 (4)=307,94, $p<0,001$], grupo [X^2 (1) = 93,05, $p<0,001$] e interação entre os fatores [X^2 (4) = 313,01, $p<0,001$].

Analisando o fator grupo, observa-se que os animais expostos à câmara de vapor consumiram em média maior quantidade de etanol comparado ao grupo AR ($\beta= 1,52$; $p<0,001$) [Ar: $1,30 \pm 0,14$ g/kg; Vapor: $2,83 \pm 0,07$ g/kg]. Analisando o fator tempo, observa-se que o consumo de etanol aumentou entre as semanas 3 e 7 ($\beta= 0,24$; $p=0,027$) [Semana 3: $2,39 \pm 0,10$ g/kg; Semana 7: $2,64 \pm 0,11$ k/kg]. Analisando a interação, observamos que o grupo VAPOR consumiu quantidade maior de etanol quando comparado ao grupo AR, levando em consideração as semanas 3 e 7 ($\beta= 1,04$; $p<0,001$).

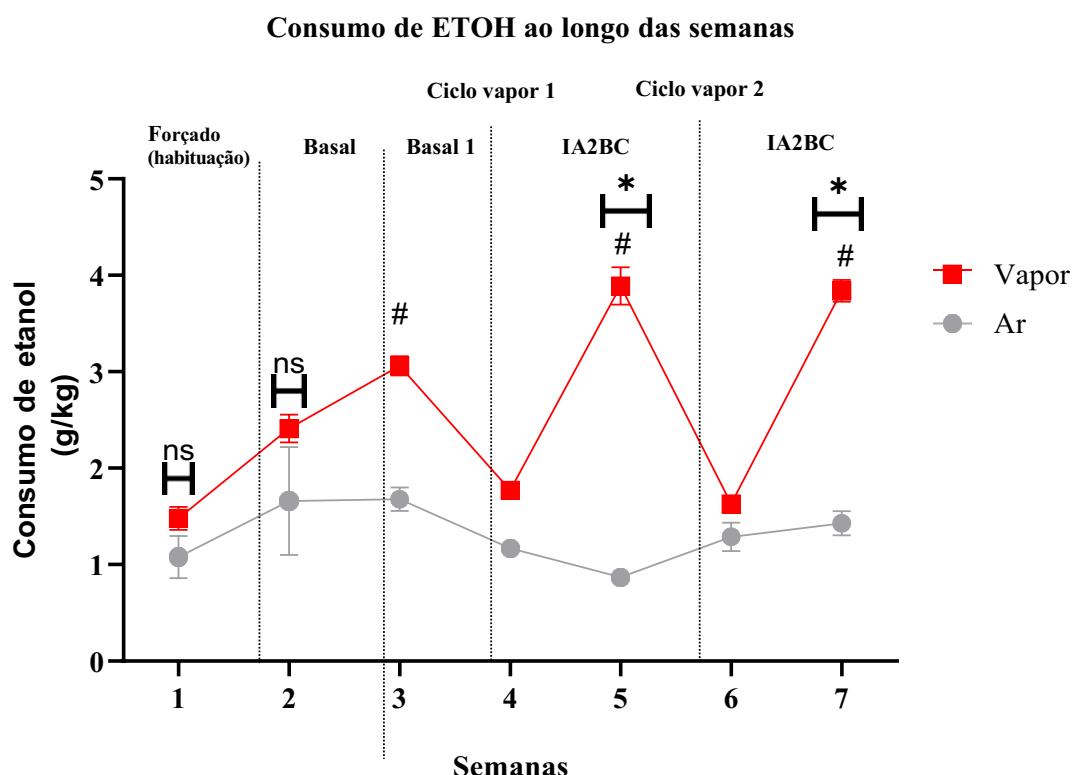
A análise de Bonferroni mostrou que o consumo de etanol no grupo VAPOR foi maior em relação ao grupo AR nas semanas 3 e 7 ($p<0,001$ em ambas as análises) [Semana 3 (Ar: $1,71 \pm 0,17$ g/kg; Vapor: $3,06 \pm 0,12$; g/kg); Semana 7 (Ar: $1,44 \pm 0,16$ g/kg; Vapor: $3,83 \pm 0,14$ g/kg)]. Além disso, para grupo VAPOR, o consumo na semana 7 foi maior comparado a semana 3 (Bonferroni $p <0,001$), enquanto para o grupo AR, não houve diferença neste consumo (Bonferroni $p=1,000$).

Em resumo, esses resultados indicam que o grupo exposto à câmara de vapor de etanol consumiu maior quantidade de etanol durante o acesso intermitente evidenciando que a exposição aos ciclos de vapor (intoxicação) aumenta o consumo de ETOH dos animais.

Figura 36. Gráfico do consumo de etanol involuntário, habituação e no protocolo de IA2BC antes, durante e depois dos ciclos de vapor. Nele pode-se observar a separação e identificação de cada etapa desse experimento 2, durante o protocolo de intoxicação ao ETOH. Nele pode-se observar que não houve diferença no consumo de etanol durante as duas primeiras semanas. Os animais expostos à câmara de vapor consumiram em média uma maior quantidade de etanol comparado ao grupo AR.

#Consumo de ETOH do grupo VAPOR aumentou na semana 3, 5 e 7 quando comparado ao grupo AR.

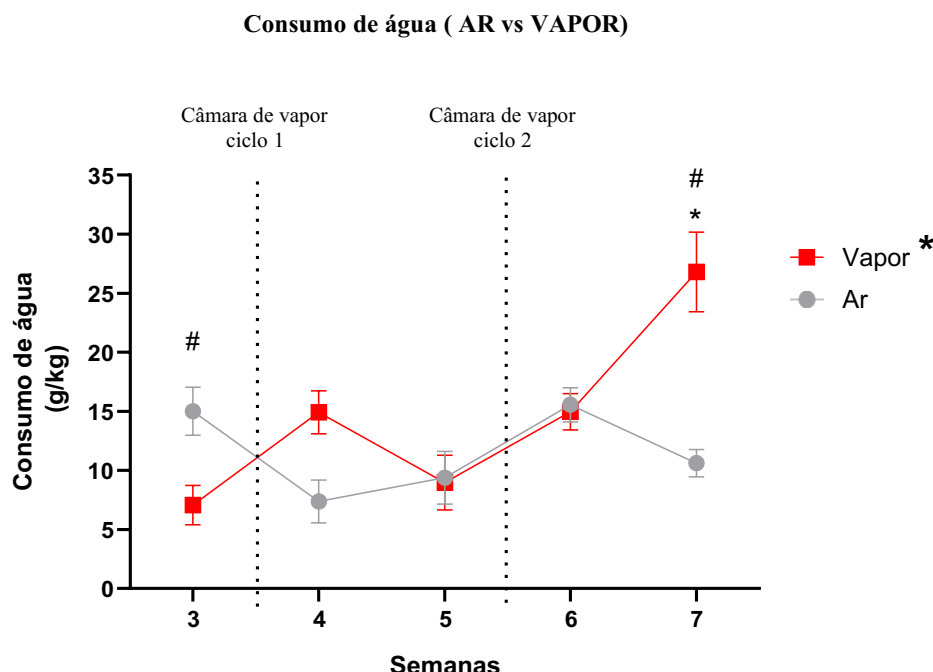
* Consumo de etanol aumentou ao longo das semanas 5 e 7 em relação à semana 3 no grupo VAPOR.



Na análise do consumo de água, figura 37, a distribuição Gamma foi a que melhor aderiu aos dados, com AIC = 790,89. Os resultados mostraram que houve efeito do tempo [X^2 (4) = 24,05, $p < 0,001$], e interação entre os fatores [X^2 (4) = 30,41, $p < 0,001$]. O efeito de grupo não foi detectado [X^2 (1) = 1,30, $p = 0,253$].

Analisando o fator tempo, observa-se que houve aumento do consumo de água ao longo das semanas 3 e 7 ($\beta = 7,8$; $p < 0,001$) [Semana 3: $11,05 \pm 1,95$ g/kg; Semana 7: $18,87 \pm 2,05$ g/kg]. A análise da interação mostrou que o grupo VAPOR consumiu uma quantidade maior de água do que o grupo AR levando em consideração as semanas 3 e 7 [$\beta = 24,42$; $p < 0,001$; Vapor: $6,86 \pm 1,46$ g/kg; $26,89 \pm 2,64$ g/kg, semanas 3 e 7, respectivamente; Ar: $15,24 \pm 3,61$ g/kg; $10,85 \pm 3,13$ g/kg, semanas 3 e 7 respectivamente]. A análise de Bonferroni mostrou que ao longo do tempo os animais do grupo VAPOR aumentaram o consumo de água ($p < 0,001$), enquanto não houve diferença no consumo nos animais do grupo AR ($p = 1,0000$).

Figura 37. Gráfico do consumo de Água no IA2BC durante o protocolo de intoxicação à câmara de vapor.
 *Os animais expostos à câmara de vapor consumiram em média maior quantidade de água quando comparado ao grupo AR. # Consumo de água do grupo VAPOR aumentou na semana 3 e 7 quando comparado a semana 3.



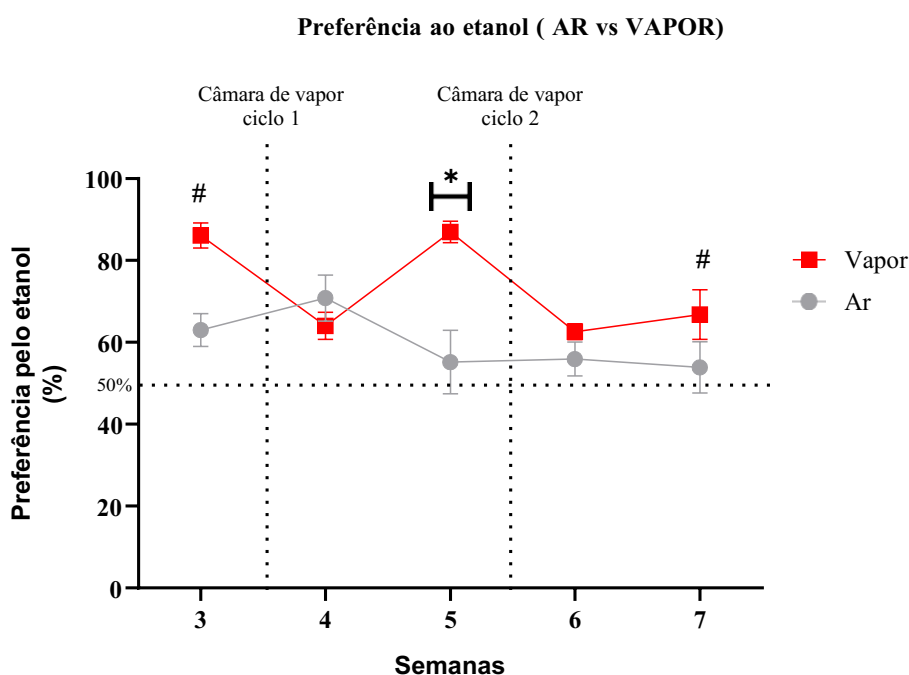
Em conjunto, esses resultados indicam que, ao longo do tempo o consumo de água aumentou nos animais expostos a câmara de vapor, e se manteve estável para o grupo ctr.

A preferência ao etanol dos animais expostos à câmara de vapor está representada na figura 38. Para essa avaliação, a distribuição Normal foi a que melhor aderiu aos dados, com AIC =964,67. Os resultados mostraram que houve efeito do tempo [$F(4,84) = 3,19$, $p = 0,017$], do grupo [$F(1,21) = 12,69$, $p = 0,002$] e da interação entre os fatores [$F(4,84) = 3,99$, $p = 0,005$].

Analisando o fator tempo, a preferência dos animais em média diminuiu comparando a semana 3 e 7 ($\beta = -14,22$; $p = 0,008$) (Sem 3: $74,54 \pm 3,83\%$ vs Sem 7: $60,31 \pm 3,83\%$). Analisando o fator grupo, observamos que o grupo exposto ao vapor de etanol apresentou, em média, maior porcentagem de preferência pelo etanol (Ar: $59,74 \pm 3,36\%$; Vapor: $73,29 \pm 1,77\%$). A interação entre os fatores mostrou que, comparando a semana 3 com a semana 7, não houve diferença na preferência do grupo AR (Sem 3: $62,97 \pm 6,78\%$; Sem 7: $53,83 \pm 6,78\%$, $p_{\text{Bonferroni}} = 1,000$), mas houve diferença para o grupo VAPOR, que tiveram em média preferência menor (Sem 3: $86,10 \pm 3,57\%$; Sem 7: $66,80 \pm 3,57\%$, $p_{\text{Bonferroni}} = 0,008$). Além disso, a análise de Bonferroni mostrou que para o grupo VAPOR houve diminuição de preferência após os ciclos de vapor de etanol (Sem 3: $86,10 \pm 3,57\%$ vs Sem 4: $64,00 \pm 3,57\%$, $p_{\text{Bonferroni}} < 0,001$; Sem 5: $86,96 \pm 3,57\%$ vs Sem 6: $62,60 \pm 3,57\%$ $p_{\text{Bonferroni}} < 0,001$),

entretanto essas diferenças não foram observadas para o grupo AR (Sem 3: $62,97 \pm 6,78\%$ vs Sem 4: $70,80 \pm 6,78\%$, Bonferroni $p=1,000$; Sem 5: $55,18 \pm 6,78\%$ g vs Sem 6: $55,91 \pm 6,78\%$, Bonferroni $p=1,000$). Esses resultados indicam que a preferência pelo etanol diminuiu ao longo das semanas nos animais expostos ao vapor de etanol.

Figura 38. Gráfico da preferência durante o protocolo de intoxicação à câmara de vapor. Nele pode-se observar que os animais expostos à câmara de VAPOR apresentaram maior preferência pelo etanol quando comparado ao grupo AR, mas a preferência de ambos os grupos diminuiu ao longo das semanas. *Comparação entre grupo Ar x Vapor. # Diminuição da preferência pelo etanol entre a semana 3 e 7.



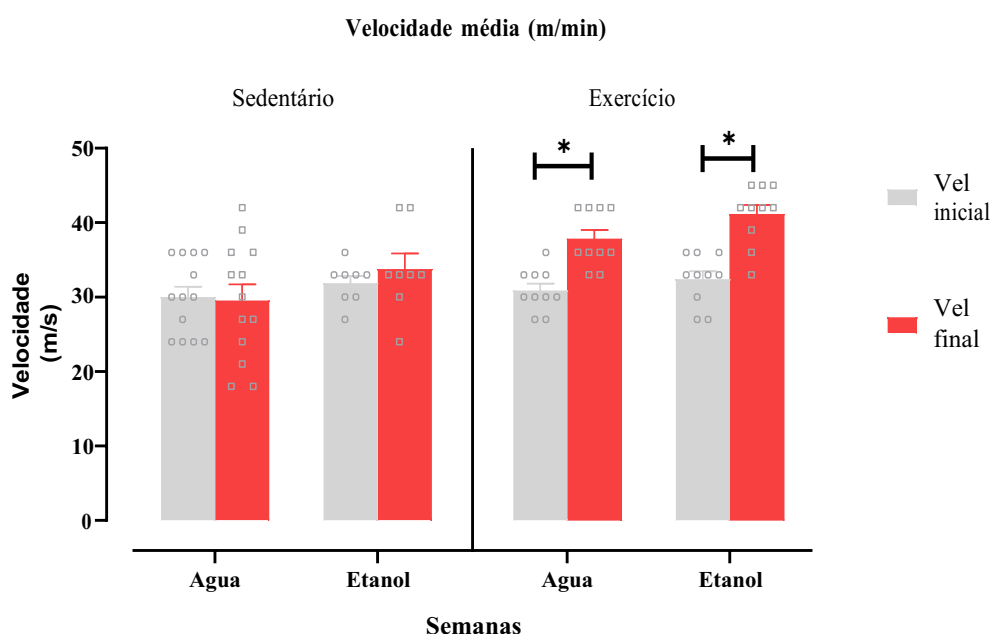
ETAPA 3: Avaliação do efeito do exercício físico através da comparação da velocidade média máxima, entre os grupos sedentários e exercitados, obtidas nos testes de esforço máximo antes e depois do protocolo de exercício físico.

Para avaliar o efeito do exercício físico foi realizado o teste de esforço de antes e depois em todos os animais do experimento. Foi realizado o teste de GEE sendo que a distribuição que melhor aderiu aos dados foi a Poisson, com AIC = 512,48.

Os resultados apresentados na figura 39 mostraram que houve efeito do tempo [$X^2(1)=9,56$, $p=0,002$], do treinamento [$X^2(1) =9,90$, $p=0,002$], do grupo [$X^2(1) =4,36$, $p=0,037$] e, além disso, observou-se interação entre tempo*treinamento [$X^2(1) =6,53$, $p=0,011$]. Para o tempo, observamos que após o treinamento a velocidade dos animais foi maior ($\beta= 4,25$

p=0,001) [Antes: $31,28 \pm 0,88$ m/s; Depois: $35,28 \pm 0,94$]. Além disso, o grupo exposto ao exercício físico teve velocidade maior do que o grupo sedentário ($\beta=4,26$ p=0,001) [Exercício: $35,32 \pm 0,94$ m/s; Sedentário: $31,25 \pm 0,88$]. Observamos também os animais expostos ao etanol tiveram velocidade maior do que os animais não expostos ($\beta=2,72$ p=0,037) [Etanol: $34,60 \pm 0,99$ m/s; Ar: $31,90 \pm 0,83$ m/s]. A interação mostrou que os animais que passaram pelo exercício físico tiveram velocidade final maior em comparação a velocidade final dos sedentários ($\beta=7,09$ p=0,006) [Exercício Antes: $31,64 \pm 1,25$ m/s; Exercício Depois: $39,39 \pm 1,40$ m/s; Sedentário Antes: $30,90 \pm 1,23$ m/s; Sedentário Depois $31,50 \pm 1,24$ m/s].

Figura 39. Gráfico da velocidade média dos animais após o protocolo de exercício físico. Nele pode-se observar que os animais exercitados apresentaram maior velocidade média depois do treinamento (vel. final) e quando comparados aos sedentários. *Diferença entre a velocidade inicial e final no grupo exercício.



Esses dados corroboram os resultados apresentados anteriormente (experimento 1) e mostram que os animais que passaram pelo exercício físico aumentaram a velocidade no último teste de esforço (Bonferroni p<0,001), enquanto para os animais sedentários não houve diferença na velocidade inicial e final (Bonferroni p=1,000), indicando que o exercício físico melhorou o desempenho dos animais, promovendo aumento na capacidade física através do aumento na velocidade desses animais.

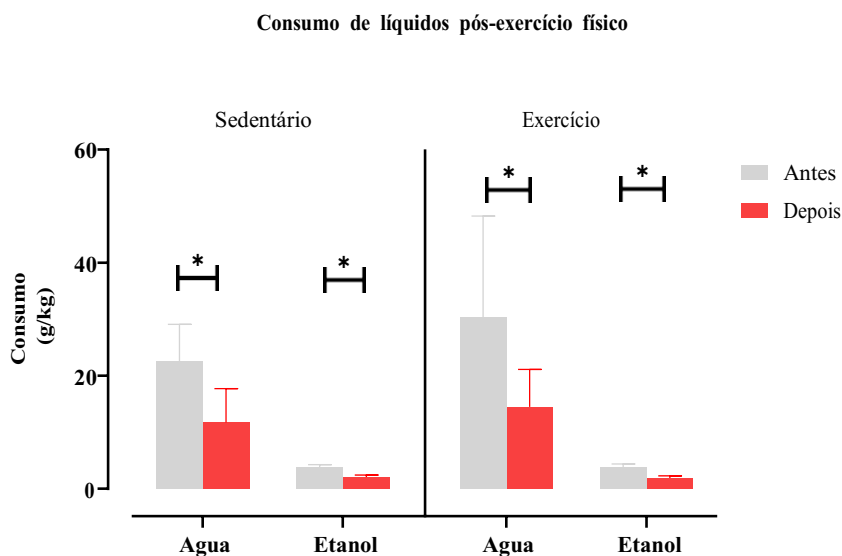
ETAPA 4: Avaliar as alterações no padrão de consumo voluntário de líquidos e preferência após o protocolo de exercício físico, somente entre os animais exercitados e

sedentário, os quais passaram pelo protocolo de intoxicação ao vapor de etanol durante a adolescência.

Para avaliar o efeito do exercício físico no consumo de etanol dos animais que foram expostos a câmara de vapor de etanol foi realizado o teste GEE. A distribuição que melhor aderiu aos dados foi a Gamma, com **AIC = 40,02**. Os resultados apresentados na figura 40 mostraram que houve efeito do tempo [$X^2(1) = 282,98$, $p < 0,001$], entretanto não houve efeito de grupo [$X^2(1) = 0,09$, $p = 0,758$] nem interação entre os fatores [$X^2(1) = 0,24$, $p = 0,623$]. Observamos que independentemente do grupo os animais consumiram em média menor quantidade de etanol na semana 8 ($\beta = -1,85$ $p < 0,001$) [Sem 7: $3,84 \pm 0,12$ g/kg; Sem 8: $1,98 \pm 0,08$ g/kg].

Em relação ao consumo de água, a distribuição que melhor aderiu aos dados foi a Gamma (AIC = 263,80). Os resultados apresentados na figura 52 mostraram que houve efeito do tempo [$X^2(1) = 31,92$, $p < 0,001$], entretanto não houve efeito de grupo [$X^2(1) = 1,04$, $p = 0,306$] e interação entre os fatores [$X^2(1) = 0,10$, $p = 0,749$]. Observamos que independentemente do grupo os animais consumiram em média uma menor quantidade de água na semana 8 ($\beta = -15,41$ $p < 0,001$) [Sem 7: $27,74 \pm 2,94$ g/kg; Sem 8: $12,32 \pm 1,74$ g/kg].

Figura 40. Gráfico do consumo de líquidos no IA2BC dos animais após o protocolo de exercício físico. Nele pode-se observar que os animais diminuíram o consumo de líquidos ao longo do tempo. *Diminuição entre o consumo antes e depois, ao longo do tempo, independentemente do tratamento e treinamento.



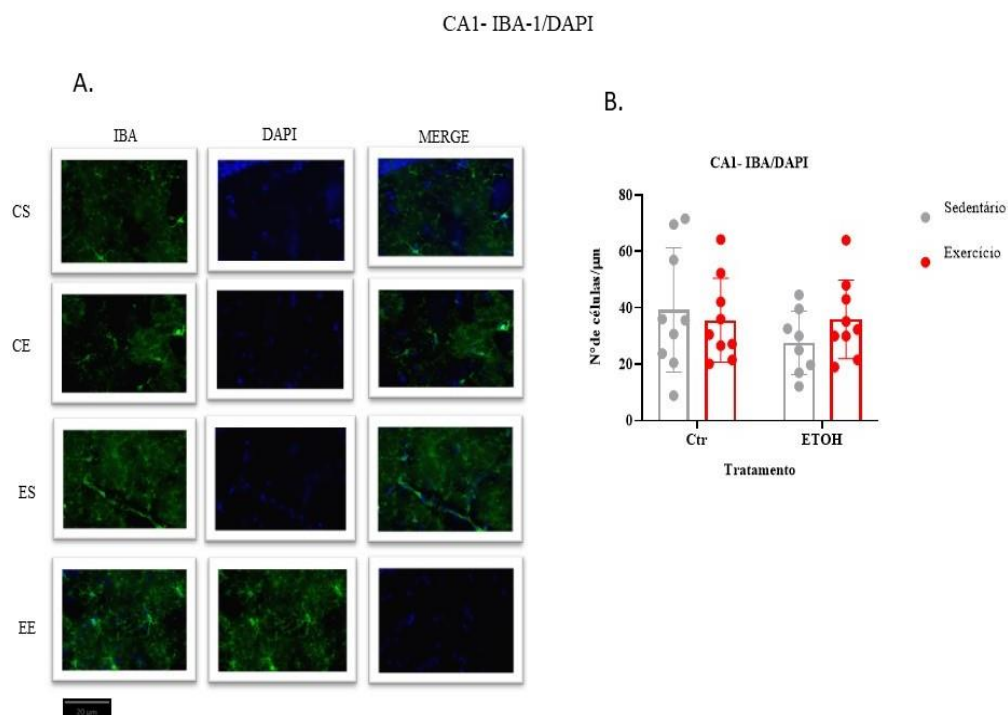
Em conjunto esses dados indicam que o exercício físico, quando realizado na abstinência protraída, levou a redução no consumo de livre escolha dos mesmos e, apesar de muitas vezes ser considerado como um possível fator estressante, não foi suficiente para reestabelecer esse comportamento nos animais.

ETAPA 5: Contagem do número de células da glia (micróglia e astrócito) comparando o efeito dos tratamentos: intoxicação de etanol, exercício físico durante a abstinência protraída e as suas interações.

Foi utilizado o modelo transversal GzLM para a análise estatística do número de células. Para as quatro variáveis (CA1- IBA, CA1-GFAP, CG-IBA e CG-GFAP), em relação ao número de células, a distribuição que mais aderiu ao modelo foi a Binomial negativa.

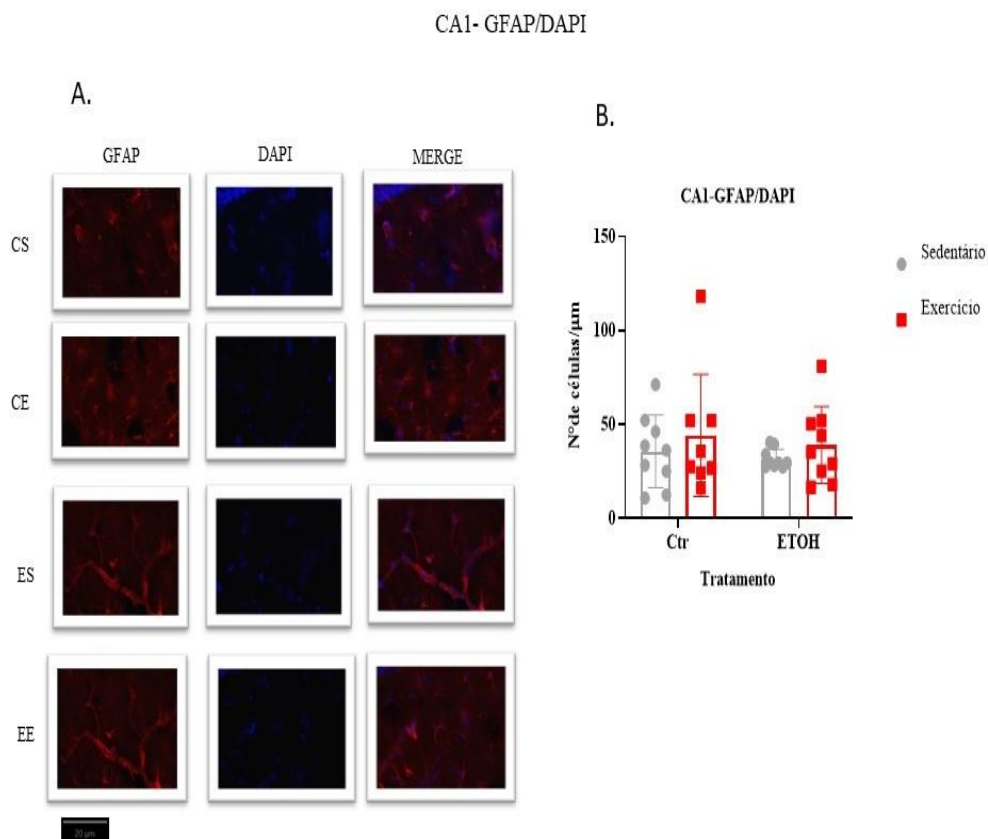
Na dupla marcação CA1-IBA/DAPI, obteve-se um AIC= 292,34. Os resultados, na figura 42, mostraram que não houve efeito do tratamento [$X^2(1) = 1,4$, $p=0,237$], do treinamento [$X^2(1) = 0,318$, $p=0,573$] e interação entre os fatores [$X^2(1) = 1,52$, $p=0,217$].

Figura 41. (A). Imagem representativa da imunofluorescência. (B) Gráfico da quantificação do número de células da dupla marcação CA1-IBA/DAPI. Não foi observada diferença estatística entre os tratamentos.



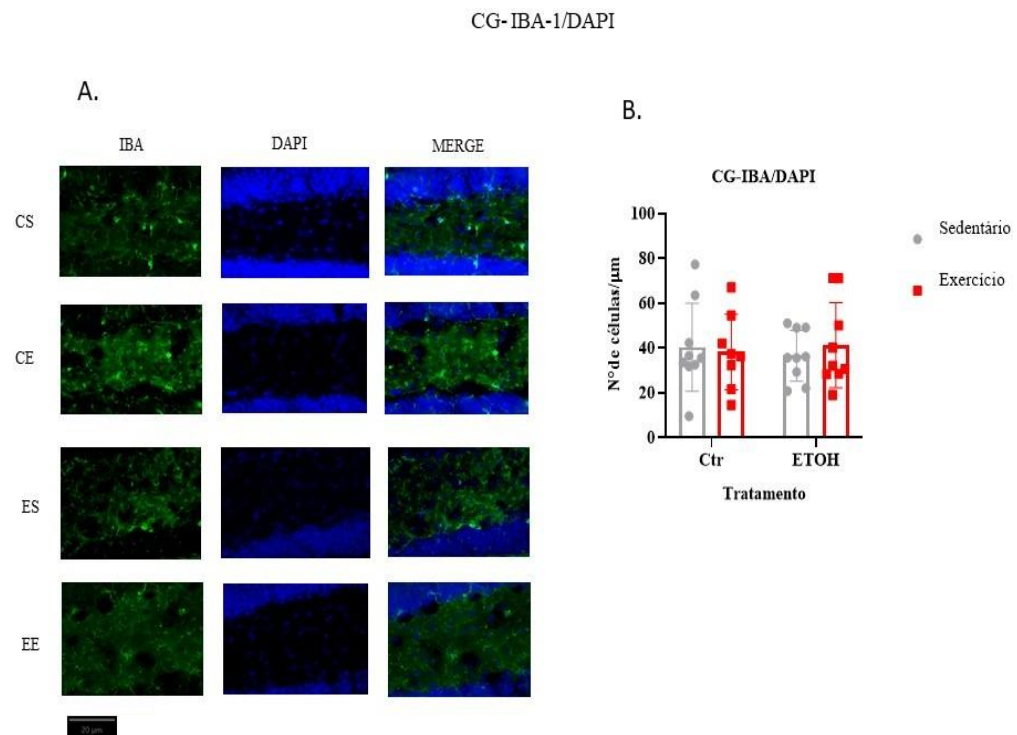
Na dupla marcação CA1-GFAP/DAPI, obteve-se um AIC= 302,79. Os resultados, na figura 43, mostraram que não houve efeito do tratamento [$X2(1) = 1,7$; $p=0,191$], do treinamento [$X2(1) = 0,553$, $p=0,457$] e interação entre os fatores [$X2(1) = 1,24$; $p=0,991$].

Figura 42. (A). Imagem representativa da imunofluorescência. (B) Gráfico da quantificação do número de células da dupla marcação CA1-GFAP/DAPI. Não foi observada diferença estatística entre os tratamentos.



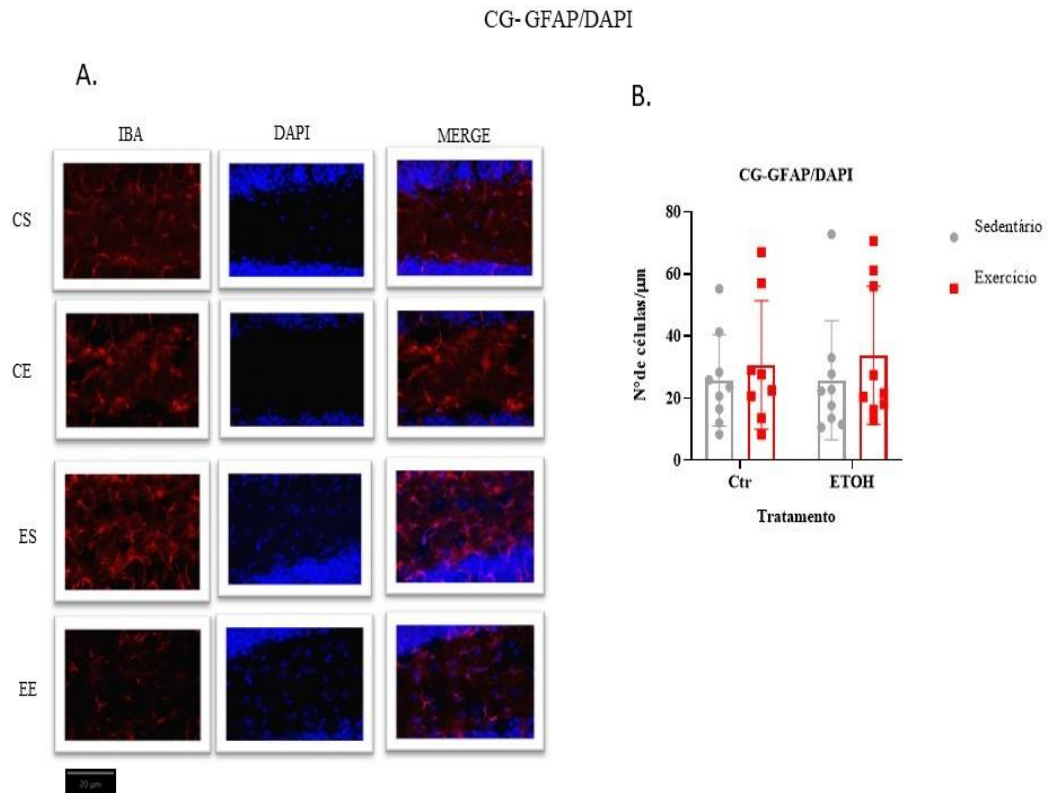
Na dupla marcação CG-IBA/DAPI, obteve-se um AIC= 298,3. Os resultados, na figura 44, mostraram que não houve efeito do tratamento [$X2(1) = 0,059$; $p=0,808$], do treinamento [$X2(1) = 0,006$; $p=0,937$] e interação entre os fatores [$X2(1) = 0,39$; $p=0,532$].

Figura 43. (A). Imagem representativa da imunofluorescência. (B) Gráfico da quantificação do número de células da dupla marcação CG-IBA/DAPI. Não foi observada diferença estatística entre os tratamentos.



Na dupla marcação CG-GFAP/DAPI, obteve-se um AIC= 296,45. Os resultados, na figura 45, mostraram que não houve efeito do tratamento [$X^2(1) = 1,28$; $p=0,257$], do treinamento [$X^2(1) = 0,006$; $p=0,803$] e interação entre os fatores [$X^2(1) = 0,057$; $p=0,810$].

Figura 44. (A. Esquerda). Imagem representativa da imunofluorescência. (B. Direita) Gráfico da quantificação do número de células da dupla marcação CG-GFAP/DAPI. Não foi observada diferença estatística entre os tratamentos.



Esses resultados, em conjunto, mostraram que os tratamentos não alteraram os números de astrócitos e micróglias marcadas pelos seus respectivos anticorpos.

5.5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL DO EXPERIMENTO 3:

“Análise comportamental e quantificação das proteínas LC3-I e II, p62, m-TORC1 (total e fosforilada) e BDNF em um modelo de associação entre a exposição ao estresse de isolamento social e à intoxicação ao vapor de etanol durante a adolescência e ao exercício físico na abstinência protraída”.

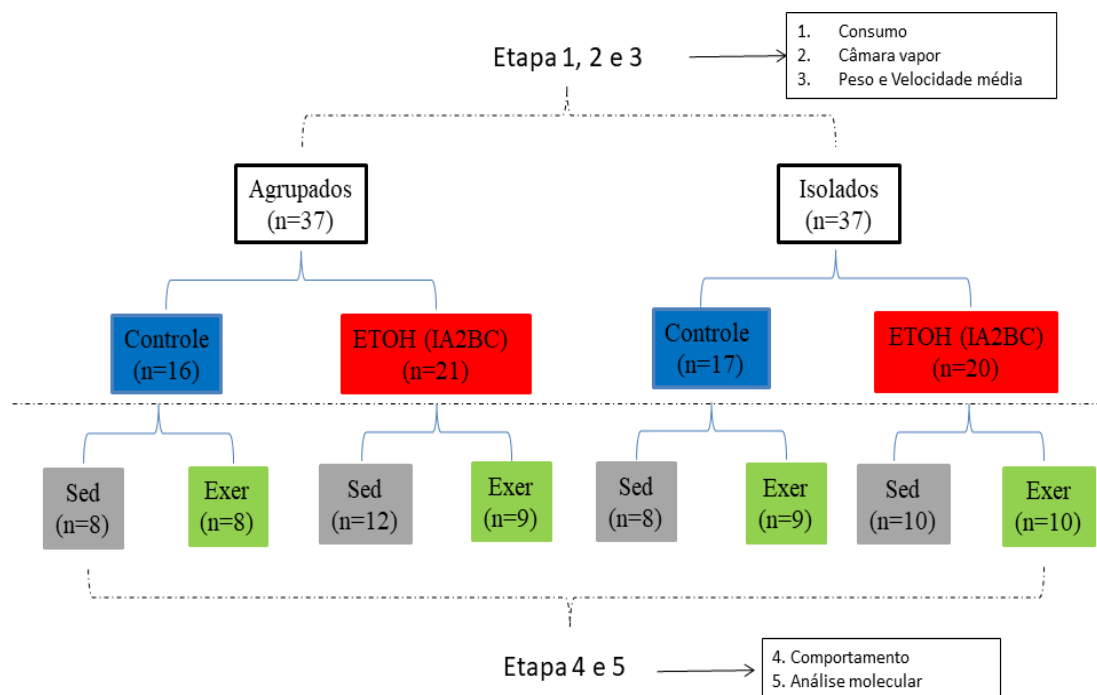
O objetivo deste experimento foi: (etapa 1): quantificar o padrão de consumo voluntário de livre escolha de etanol (IA2BC) entre os animais isolados e agrupados e quantificar as alterações no padrão de consumo voluntário de etanol antes e após a exposição cíclica à câmara de vapor entre os animais isolados e os agrupados; (etapa 2) avaliar o desempenho dos camundongos através da velocidade máxima (m/min) ao longo dos tratamentos; (etapa 3) quantificar as alterações no padrão de comportamento dos animais que passaram ou não pelo

isolamento social e intoxicação ao etanol, após o exercício físico realizado na abstinência protraída; (etapa 4) quantificar alterações no padrão de expressão de proteínas, no hipocampo, após o isolamento social, a intoxicação de etanol, a prática do exercício físico na abstinência protraída e na associação entre eles.

Para a realização deste experimento os animais foram separados em oito grupos experimentais (figura 57): (1) controle sedentário agrupado (CSa; n=8), animais mantidos em suas caixas moradias com mais quatro animais, que não passaram por nenhum protocolo experimental (IA2BC, câmara de vapor e exercício físico); (2) controle exercitado agrupado (CEa; n=8), animais mantidos em suas caixas moradias com mais quatro animais, que não passaram pelo protocolo de etanol (IA2BC e câmara de vapor), mas passaram pelo protocolo de exercício físico; (3) etanol sedentário agrupado (ESa; n=12), animais mantidos em suas caixas moradias com mais quatro animais, que passaram pelos protocolos de etanol (IA2BC e câmara de vapor), mas não passaram pelo exercício físico; (4) etanol exercitado agrupado (EEa; n=9), animais mantidos em suas caixas moradias com quatro animais, que passaram pelo protocolo de etanol (IA2BC e câmara de vapor) e pelo protocolo de exercício físico; (5) controle sedentário isolado (CSi; n=8), animais mantidos isolados em suas caixas moradias, que não passaram por nenhum protocolo experimental (IA2BC, câmara de vapor e exercício físico); (6) controle exercitado isolado (CEi; n=9), animais mantidos isolados em suas caixas moradias, que não passaram pelos protocolos de exposição ao etanol (IA2BC e câmara de vapor), mas passaram pelo protocolo de exercício físico; (7) etanol sedentário isolado (ESi; n=10), animais mantidos isolados em suas caixas moradias, que passaram pelos protocolos de exposição ao etanol (IA2BC e câmara de vapor), mas não passaram pelo exercício físico; (8) etanol exercitado isolado (EEi; n=10), animais mantidos isolados em suas caixas moradias, que passaram pelo protocolo de exposição ao etanol (IA2BC e câmara de vapor) e pelo protocolo de exercício físico, demonstrado na figura abaixo.

Figura 45. Esquema dos oito grupos experimentais: (1) controle sedentário agrupado (CS); (2) controle exercitado agrupado (CEa), (3) etanol sedentário agrupado (ESa), (4) etanol exercitado agrupado (EEa), (5)

controle sedentário isolado (CSi), (6) controle exercitado isolado (CEi), (7) etanol sedentário isolado (ESi), (8) etanol exercitado isolado (EEi).



Fonte 35. Esquema criado pela própria autora.

Aos 21 dias de idade esses animais, ao serem transferidos para o biotério de experimentação animal, foram separados em dois grupos: (1) isolados: permaneceram sozinhos em suas caixas moradia durante a execução de todas as etapas do experimento e (2) agrupados: foram mantidos em grupos de quatro animais dentro das caixas moradia, por todo o experimento, sendo separados apenas para a execução de etapas específicas ao longo do experimento.

A partir da segunda semana (semana 2), aos 28 dias de idade, iniciou-se o protocolo de consumo voluntário de etanol e água através do protocolo IA2BC (3.7) com os animais dos grupos ESa, EEa, ESi e EEi que tiveram livre acesso aos bebedouros de etanol 10% e água, três dias na semana, de forma intercalada, durante 4 horas. A medida do consumo de líquidos foi realizada através da pesagem dos bebedouros antes e após o consumo. Todos os animais foram pesados no primeiro dia de cada semana, tanto para o protocolo de consumo e exposição ao etanol quanto o protocolo do exercício físico.

Ao final da quarta semana de IA2BC (semana 5 na tabela 3) esses animais foram submetidos ao protocolo de exposição ao etanol pela câmara de vapor, o qual foi realizado por duas semanas consecutivas com o objetivo de intensificar os ciclos de intoxicação (16h de vapor) e abstinência (8h de oxigênio) e aumentar os valores de BECs para que fossem consistentes com os valores de intoxicação. Após a segunda semana da exposição ao vapor, os animais passaram novamente pelo protocolo do IA2BC, entretanto, este foi realizado por apenas uma semana (semana 8). Com esse delineamento foi possível comparar as alterações entre o padrão de consumo dos animais sob o efeito apenas do fator estresse “isolamento social” ou não (IA2BC apenas) (semana 2 até semana 5), assim como foi possível avaliar o efeito da associação entre o fator estresse prévio com os quadros de intoxicação no padrão de consumo desses animais (IA2BC + câmara de vapor) (semana 5 e semana 8).

Decorridos 48h do último ciclo de IA2BC (semana 8), iniciou-se a adaptação à esteira de exercício físico com todos os animais de todos os grupos. Os animais foram submetidos ao TEM1 e separados entre sedentários, aqueles que não seguiriam o protocolo de treinamento - e exercitados, aqueles que seguiriam o protocolo de treinamento. A partir desse momento, o objetivo foi avaliar o efeito do exercício físico (CE e EE) ou sedentarismo (CS e ES) durante o período de abstinência protraída, entre os grupos dos animais que passaram pela intoxicação ao etanol (ES e EE) comparado com os animais que não tiveram contato nenhum com o etanol (CS e CE). Ao final desse protocolo, os animais não tiveram mais contato com o etanol e foram submetidos aos testes comportamentais, como apresentado na tabela 5 abaixo.

Tabela 5. Representação do protocolo experimental ao longo das semanas. Nas linhas estão representadas as semanas, nas colunas estão representados os dias e no cruzamento, qual foi o tratamento.

Fases	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6	Dia 7
Semana 1	ISOLAMENTO SOCIAL/ AGRUPADOS						
Semana 2	IA2BC	x	IA2BC	x	IA2BC	x	x
Semana 3	IA2BC	x	IA2BC	x	IA2BC	x	x
Semana 4	IA2BC	x	IA2BC	x	IA2BC	x	x
Semana 5	IA2BC	x	IA2BC	x	IA2BC	x	x
Ciclo 1	CÂMARA DE VAPOR					x	x
Ciclo 2	CÂMARA DE VAPOR					x	x
Semana 8	IA2BC	x	IA2BC	x	IA2BC	x	x
Exercício físico	Exercício					x	x
Exercício físico	Exercício					x	x
Exercício físico	Exercício					x	x
Exercício físico	Exercício					x	x
Comportamento	LCE	x	CA	RO (1h)	RO (24h)	x	x
Comportamento	Grooming	x	Rotarod (treino)	Rota rod	Nado forçado	x	x

Fonte 36. Tabela construída pela própria autora.

Após 24 horas do final da última semana dos testes comportamentais, os animais foram anestesiados e os encéfalos foram coletados à fresco, congelados (isopentano em gelo seco) e armazenados a -80°C. A região do hipocampo foi dissecada no criostato a -20°C, por meio de agulhas de ponta chata de 18-20 gauge e colocada em tubos criogênico. Os tubos foram congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer -80°C, para posterior quantificação de proteínas e realização da técnica de *Western blotting*.

5.6 RESULTADOS DO EXPERIMENTO 3:

Durante o período de intoxicação ao etanol pela câmara de vapor foram coletadas algumas amostras do sangue dos animais para acompanhar os valores da alcoolemia (entre 91 e 125 mg/dL). Esses resultados estão apresentados na tabela 6 abaixo.

Tabela 6. Valores sanguíneos da alcoolemia dos animais que passaram pelo protocolo de intoxicação ao etanol pela câmara de vapor e dos animais do grupo controle.

Grupo	Tratamento	Conc (g/L)	mg/dL
Caixa vapor 1	Semana 2	1,25	125
Caixa vapor 2	Semana 2	0,91	91
Caixa vapor 3	Semana 2	0,98	98
Caixa vapor 4	Semana 2	1,09	109
Controle	Exp 3	0,08	8

ETAPA 1: Quantificação das alterações no padrão de consumo voluntário intermitente (IA2BC) durante a adolescência de animais submetidos ao estresse do isolamento social e controles (semanas 2 e 5):

5.6.1 Consumo de etanol

Para o consumo de etanol, a distribuição Gamma foi a que melhor aderiu aos dados (AIC =629,45). Os resultados, apresentados na figura 60, mostraram que houve efeito do tempo [$X^2(3) = 134,08$, $p < 0,001$], grupo [$X^2(1) = 15,97$, $p < 0,001$] e interação entre os fatores [$X^2(3) = 80,44$, $p < 0,001$].

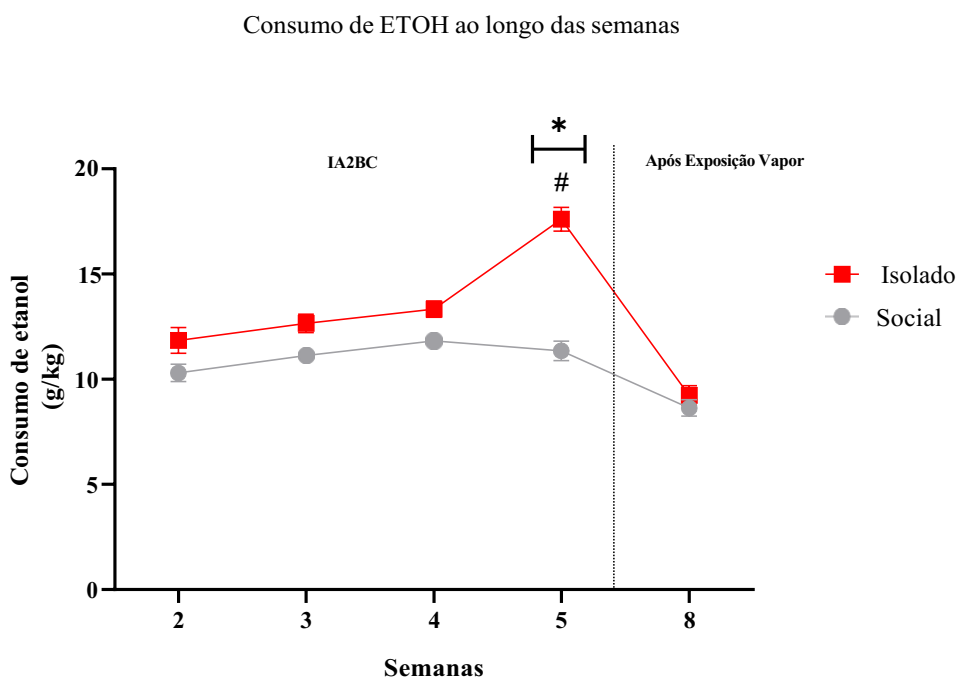
Analisando o fator grupo, observamos que os animais isolados consumiram em média maior quantidade de etanol comparado ao grupo agrupado ($\beta = -2,25$; $p < 0,001$) [agrupado: $11,28 \pm 0,48$ g/kg; Isolado: $13,93 \pm 0,48$ g/kg]. Analisando o fator tempo, observamos que, em média, o consumo de etanol aumentou entre as semanas 2 e 5 ($\beta = 3,53$; $p < 0,001$) [Semana 2: $11,03 \pm 0,36$ g/kg; Semana 5: $14,57 \pm 0,40$ g/kg].

Analisando a interação, observamos que, em média, para os animais do grupo agrupado não houve diferença entre as quantidades de etanol consumidas comparando as semanas 2 e 5, enquanto que para o grupo Isolado, os animais consumiram quantidade de etanol maior na semana 5 comparado a semana 2 [Isolados (Semana 2: $11,72 \pm 0,51$ g/kg; Semana 5: $17,74 \pm 0,60$ g/kg, Bonferroni $p < 0,001$); Agrupados (Semana 2: $10,35 \pm 0,51$ g/kg; Semana 5: $11,39 \pm 0,53$ g/kg, Bonferroni $p = 0,104$].

Ressaltamos que na semana 2 não havia diferença entre a quantidade de etanol consumida pelos grupos [Semana 2 (Agrupados: $10,35 \pm 0,51$ g/kg; Isolado: $11,72 \pm 0,51$ g/kg Bonferroni $p=1,000$)]. Entretanto, na última semana, o grupo isolado apresentou um consumo maior [Semana 5 (Agrupados: $11,39 \pm 0,53$ g/kg; Isolados: $17,74 \pm 0,60$ g/kg, $p < 0,001$)].

Analisando o consumo após a exposição aos ciclos de vapor, os resultados apresentados na figura 46 mostraram que houve efeito do tempo [$X^2(1) = 237,90$, $p < 0,001$], grupo [$X^2(1) = 28,15$, $p < 0,001$] e interação entre os fatores [$X^2(1) = 62,89$, $p < 0,001$]. Analisando o fator grupo, observamos que os animais isolados consumiram em média maior quantidade de etanol comparado ao grupo agrupados ($\beta = 3,34$; $p < 0,001$) [Isolado: $13,36 \pm 0,46$ g/kg; Agrupados: $10,01 \pm 0,41$ g/kg]. Além disso, observamos que, em média, o consumo de etanol diminuiu após as semanas de exposição ao vapor de etanol ($\beta = -5,54$; $p < 0,001$) [Semana 5: $14,45 \pm 0,40$ g/kg; Semana 8: $8,91 \pm 0,32$ g/kg]. A interação mostrou que o grupo Isolado consumiu uma maior quantidade de etanol na semana 5 comparado ao grupo Agrupado [Semana 5 (Agrupado: $11,36 \pm 0,50$ g/kg; Isolado: $17,58 \pm 0,63$ g/kg, $p < 0,001$)]. Entretanto, após a exposição ao vapor, o consumo de etanol entre os grupos foi semelhante [Semana 8 (Agrupado: $8,66 \pm 0,45$ g/kg; Isolado: $9,15 \pm 0,45$ g/kg Bonferroni $p=1,000$)].

Figura 46. Gráfico do consumo de etanol no IA2BC antes e depois dos ciclos de vapor. Nele pode-se observar a separação e identificação de cada etapa desse experimento 3, durante o protocolo de intoxicação ao ETOH. Os animais isolados consumiram em média maior quantidade de etanol comparado ao grupo agrupados. *Diferença no consumo de etanol entre as semanas 2 e 5 no grupo isolado. # Aumento no consumo de ETOH do grupo isolado, em relação ao agrupado, na semana 5.



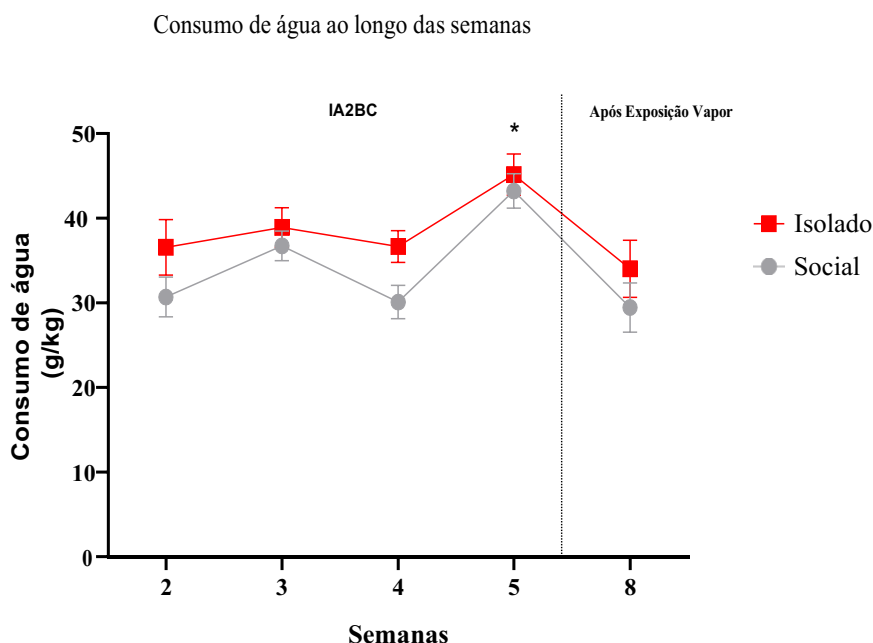
5.6.2 Consumo de água

Para o consumo de água, a distribuição Gamma, foi a que melhor aderiu aos dados ($AIC = 1020,95$). Os resultados, apresentados na figura 47, mostraram que houve efeito apenas do tempo [$X^2(3) = 49,19$, $p < 0,001$]. O efeito de grupo e interação não foi detectado [$X^2(1) = 1,45$, $p = 0,228$] e [$X^2(3) = 3,74$, $p = 0,290$], respectivamente. Analisando o fator tempo, houve aumento do consumo de água ao longo das semanas 2 e 5 ($\beta = 11,87$; $p < 0,001$) [Semana 2: $32,96 \pm 1,84$ g/kg; Semana 5: $44,83 \pm 2,10$ g/kg].

Analisando o consumo de água após a exposição aos ciclos de vapor, a distribuição que melhor aderiu aos dados foi a Normal ($AIC = 650,52$). Os resultados apresentados na figura 64 mostraram que houve efeito apenas do tempo [$F(1,39) = 29,65$, $p < 0,001$]. O efeito de grupo e interação não foram detectados [$F(1,39) = 1,05$, $p = 0,310$] e [$F(1,39) = 0,33$, $p = 0,564$] respectivamente.

Analisando o fator tempo, houve diminuição do consumo de água entre as semanas 5 e 8 ($\beta = 11,87$; $p < 0,001$) [Semana 5: $44,20 \pm 1,95$ g/kg; Semana 8: $31,75 \pm 1,95$ g/kg].

Figura 47. Gráfico do consumo de água no IA2BC durante o protocolo de isolamento social. Nele pode-se observar que os animais consumiram em média maior quantidade de água ao longo do tempo. * Aumento no consumo de água entre as semanas 2 e 5, independente do grupo



5.2.3 Preferência pelo etanol

Para a avaliação da preferência pelo etanol, a distribuição Normal foi a que melhor aderiu aos dados (AIC = 1063,78). Os resultados, apresentados na figura 48, mostraram que houve efeito do tempo [$F(3,117) = 14,58$, $p < 0,001$], e da interação entre os fatores [$F(3,117) = 3,70$, $p = 0,014$], entretanto não houve efeito do grupo [$F(1,39) = 2,10$, $p = 0,155$].

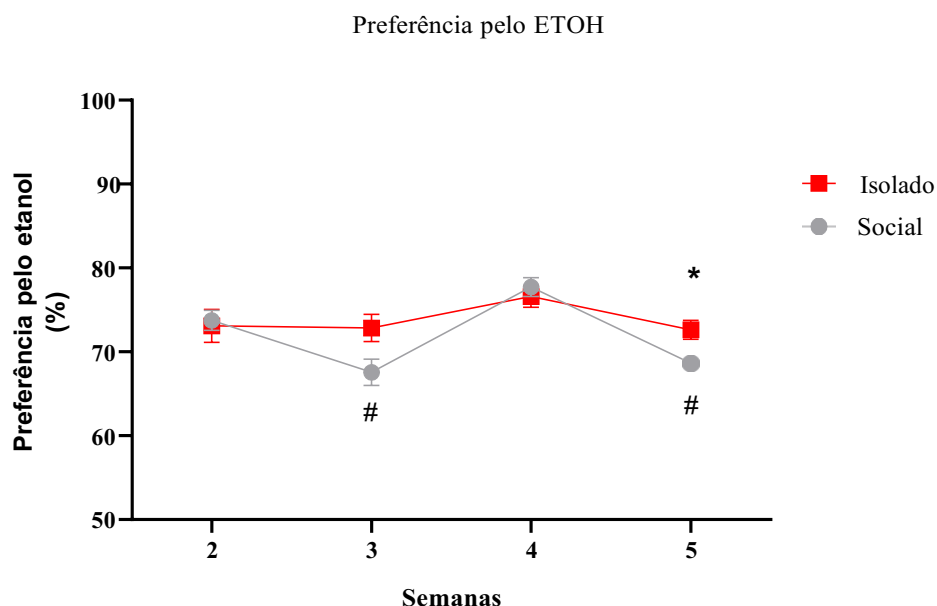
Analisando o fator tempo, a preferência dos animais em média diminuiu comparando a semana 2 e 5 ($\beta = -2,77$; $p = 0,021$) (Sem 2: $73,41 \pm 0,97\%$ vs Sem 5: $70,63 \pm 0,97\%$).

Analisando o grupo, observamos que não houve diferença na preferência pelo etanol entre os grupos. Os grupos apresentaram preferência semelhante pelo etanol (Social: $71,91 \pm 0,70\%$; Vapor: $73,78 \pm 0,92\%$, $p = 0,155$).

Observamos que analisando a primeira e a última semana, não houve diferença na preferência dentro dos grupos Isolado (Sem 2: $73,08 \pm 1,39\%$; Sem 5: $72,62 \pm 1,39\%$, $p_{\text{Bonferroni}} = 1,000$) e Agrupado (Sem 2: $73,74 \pm 1,35\%$; Sem 5: $68,64 \pm 1,35\%$, $p_{\text{Bonferroni}} = 0,073$). Apesar disto, o efeito de interação mostrou maior variação na preferência do grupo agrupado, que apresentou uma diminuição na preferência entre as semanas 3 vs 2 (Sem 2: $73,74 \pm 1,35\%$; Sem 3: $67,55 \pm 1,35\%$; $p = 0,008$) e entre as semanas 5 vs 4 (Sem 4: $77,69 \pm 1,35\%$; Sem 5: $68,64 \pm 1,35\%$; $p < 0,001$). Para o grupo isolado esse efeito não foi observado (Sem 2: $73,08 \pm$

1,39%; Sem 3: $72,82 \pm 1,39\%$; $p = 1,000$) e (Sem 4: $76,59 \pm 1,39\%$; Sem 5: $72,62 \pm 1,39\%$; $p = 1,000$). Portanto, esses dados inferem que a exposição aos ciclos de vapor não alterou a preferência dos animais.

Figura 48. Gráfico da preferência por etanol no IA2BC durante o protocolo de isolamento social.
*Diminuição na média da preferência entre as semanas 2 e 5, independente do grupo. #Diminuição da preferência, no grupo agrupado, na semana 3 e 5.



Em resumo, os resultados do consumo de etanol indicaram que o grupo Isolado consumiu maior quantidade de etanol na quinta semana de acesso intermitente, mostrando que o isolamento social aumentou o consumo de etanol dos animais; entretanto, após a exposição aos ciclos de vapor, não houve diferença de consumo entre os grupos.

Os resultados do consumo de água indicaram que, ao longo das 4 semanas iniciais o consumo de água dos animais aumentou independente do grupo e que após a exposição aos ciclos de vapor, esse consumo foi reduzido independente do grupo.

Em relação à preferência, nossos resultados indicaram que apesar da intoxicação ao vapor de etanol na câmara de vapor não ter aumentada a preferência pelo ETOH ao longo das semanas, ainda assim, os animais tiveram uma maior preferência pelo etanol em relação à água, ao longo das semanas, pois de uma forma geral, o valor se manteve acima de 50%.

ETAPA 2: Verificação do desempenho dos camundongos através da comparação entre as velocidades máximas de corrida antes e após o protocolo de exercício físico:

Para avaliar o efeito do exercício físico antes e depois do teste de esforço de animais agrupados ou isolados, que consumiram ou não etanol, foi realizado o teste de GEE e a distribuição que melhor aderiu ao dado foi a de Poisson (AIC = 897,65).

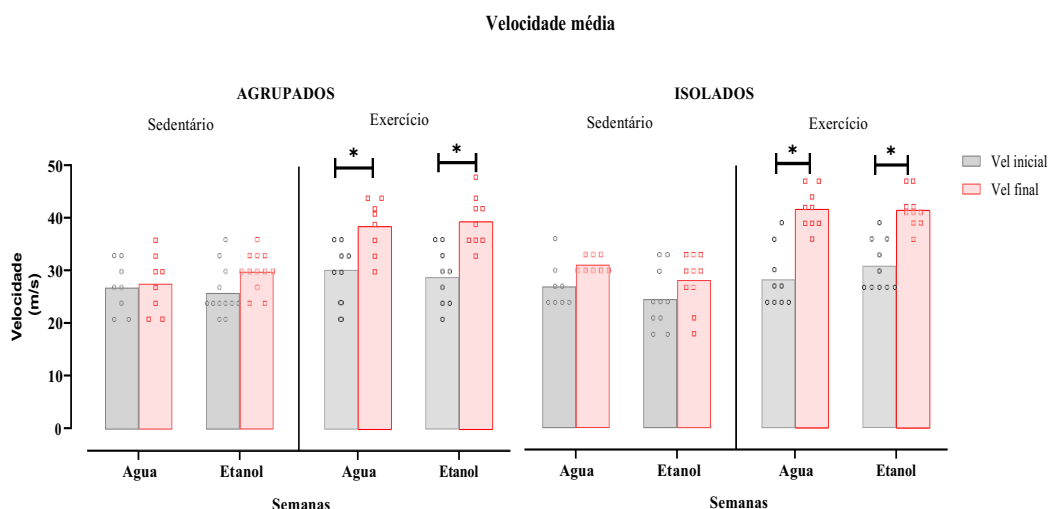
Os resultados apresentados na figura 49 mostraram que houve efeito do tempo [$X^2(1) = 49,46$, $p < 0,001$], do treinamento [$X^2(1) = 55,612$, $p < 0,001$] e interação entre tempo*treinamento [$X^2(1) = 10,41$, $p = 0,001$]. Não houve efeito de consumo [$X^2(1) = 0,16$, $p = 0,688$], de homecage [$X^2(1) = 0,23$, $p = 0,630$] e nem interação entre outros fatores.

Para o tempo, observamos que após o treinamento houve um aumento na velocidade dos animais ($\beta = 6,95$ $p < 0,001$) [Antes: $27,82 \pm 0,61$ m/s; Depois: $34,34 \pm 0,69$].

Além disso, o grupo exposto ao exercício físico teve velocidade maior do que o grupo sedentário ($\beta = 7,26$ $p < 0,001$) [Exercício: $34,98 \pm 0,71$ m/s; Sedentário: $27,71 \pm 0,63$].

A interação mostrou que os animais que passaram pelo exercício físico tiveram diferença maior entre as médias das velocidades inicial e final em comparação a diferença entre as médias de velocidade dos sedentários ($\beta = 7,45$ $p < 0,001$) [Exercício Antes: $29,64 \pm 0,92$ m/s; Exercício Depois: $40,32 \pm 1,07$ m/s; Sedentário Antes: $26,10 \pm 0,85$ m/s; Sedentário Depois: $29,33 \pm 0,90$ m/s].

Figura 49. Gráfico da velocidade dos animais. Nele pode-se observar que a VM final dos animais aumentou em todos os animais exercitados. *Aumento na VM final em relação à VM inicial nos animais exercitados, independente da homecage e tratamento.



Esses resultados sugerem que o exercício físico melhorou o desempenho dos animais, promovendo aumento na capacidade física, o que foi observado através do aumento na velocidade desses animais.

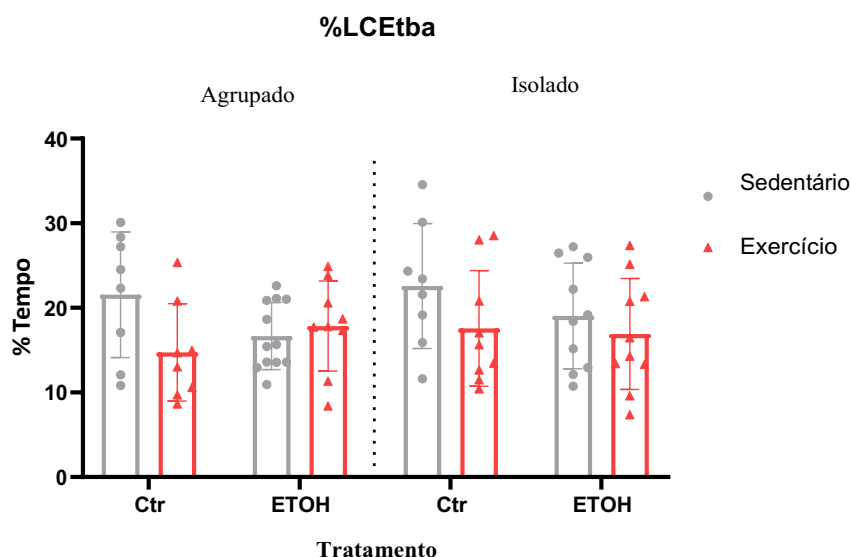
ETAPA 4: Verificação das alterações nos comportamentos do tipo ansioso, transtorno de humor tipo depressivo, na memória e na coordenação motora entre os oito grupos experimentais.

4.1 Quantificação dos parâmetros do LCE (%LCEtba, %LCEeba, LCEebf):

- **Porcentagem de Tempo de Permanência nos Braços Abertos (%LCEtba):**

Em relação à frequência no tempo de permanência nos braços abertos, a distribuição que melhor aderiu aos dados foi a Gamma (AIC =496,02). Os resultados apresentados na figura 50 mostraram que não houve efeito do homecage [$X^2(1) = 0,55$, $p = 0,455$], consumo [$X^2(1) = 1,66$, $p = 0,197$], treinamento [$X^2(1) = 2,77$, $p = 0,096$] e nem das interações.

Figura 50. Gráfico da frequência no tempo de permanência nos braços abertos. Nele pode-se observar que não houve efeito de nenhum dos fatores (homecage, tratamento e treinamento).



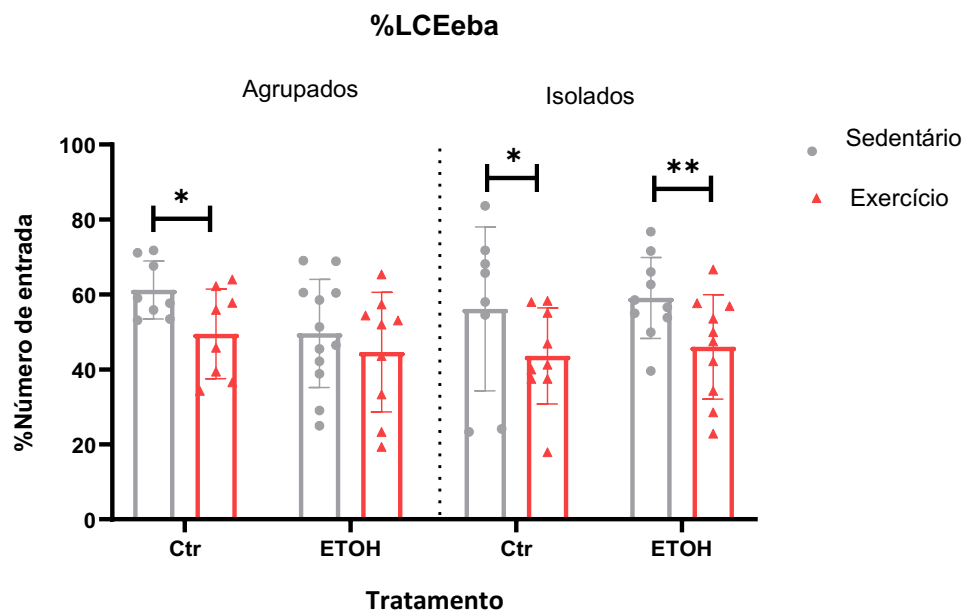
Frequência de entrada no Braço Aberto (%LCEeba):

Em relação a %LCEeba, a distribuição que melhor aderiu aos dados foi a Normal (AIC =611,61). Os resultados mostraram que não houve efeito do homecage [$X^2(1) = 1,8$, $p = 0,989$],

consumo [$X^2(1) = 0,703$, $p = 0,402$] e das interações, mas houve efeito do treinamento [$X^2(1) = 10,17$, $p = 0,001$].

Em relação ao treinamento, após o post Hoc de Bonferroni, foi possível observar que ocorreu diminuição na frequência de entrada nos braços abertos pelos animais exercitados em comparação aos sedentários (Bonferroni $p = 0,002$) [exercício: $46 \pm 2,36$; Sedentários: $56,5 \pm 2,33$].

Figura 51. Gráfico da frequência de entrada nos braços abertos. * Diminuição na frequência de entrada nos braços abertos pelos animais exercitados em comparação aos sedentários.

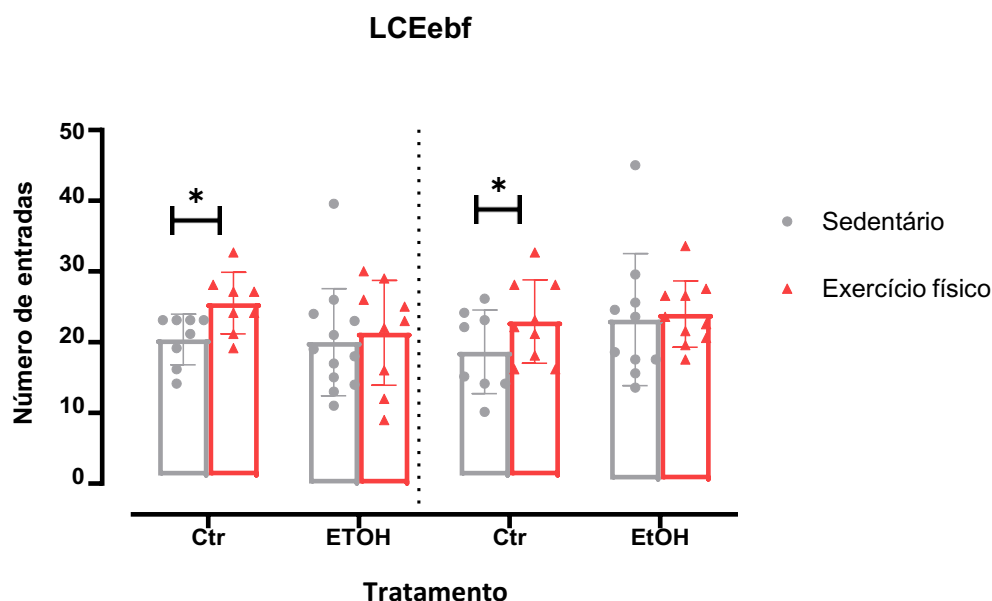


- Entrada no Braço Fechado (LCEebf):

Em relação ao LCEebf, a distribuição que melhor aderiu aos dados foi a Poisson (AIC = 503,68). Os resultados apresentados na figura 52, mostraram que não houve efeito do homecage [$X^2(1) = 0,0055$, $p = 0,941$], do consumo [$X^2(1) = 1,04$, $p = 0,306$] e das interações, mas houve efeito do treinamento [$X^2(1) = 7,13$, $p = 0,008$].

Em relação ao treinamento, após o post Hoc de Bonferroni, foi possível observar que ocorreu diminuição nos números de entradas nos braços fechados pelos animais sedentários em comparação aos exercitados (Bonferroni $p = 0,008$) [exercício: $22,7 \pm 0,798$; Sedentários: $19,8 \pm 0,730$].

Figura 52. Gráfico do número de entradas nos braços fechados. *Aumento no número de entradas nos braços fechados pelos animais exercitados quando comparados aos sedentários.



Em conjunto esses dados mostram que o exercício físico não alterou a frequência de permanência nos braços abertos (%LCEtba), mas reduziu a frequência de entrada nos braços abertos (%LCEeba), sugerindo possível aumento no comportamento tipo ansioso nesses animais exercitados. A análise do aumento do número de entradas no braço fechado pode ser um indicativo de que o exercício físico aumentou a locomoção dos animais no aparato, o que reforçou a hipótese do surgimento do comportamento tipo ansioso, uma vez que mesmo tendo a locomoção aumentada, o tempo e número de entradas foi menor nos braços abertos.

4.2 Quantificação do parâmetro do Campo Aberto (%CAzc)

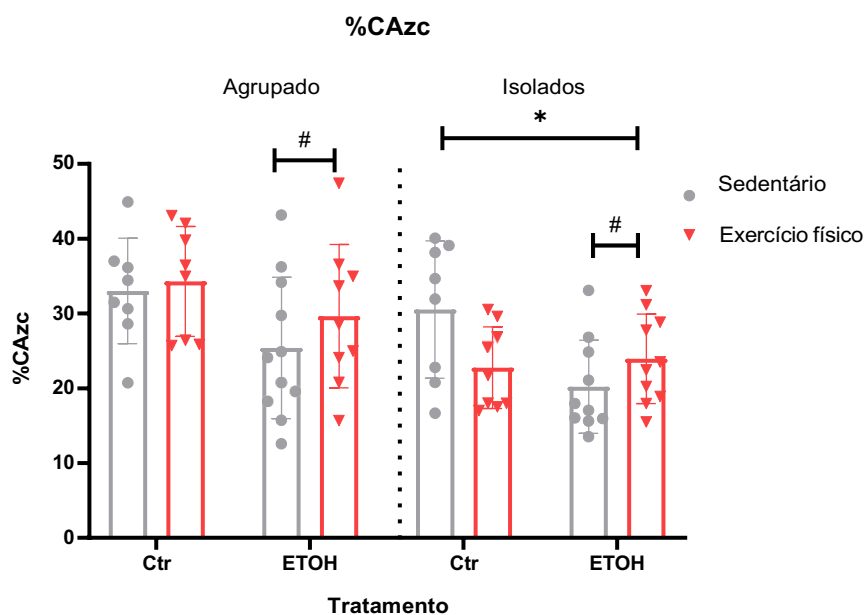
- Porcentagem de tempo de permanência na zona central (%CAztc):

Em relação a %CAztc, a distribuição que melhor aderiu aos dados foi a Normal (AIC =521,5). Os resultados apresentados na figura 53 mostraram que houve efeito do homecage [$X^2(1) = 12,50$, $p < 0,001$] e consumo [$X^2(1) = 8,28$, $p = 0,004$], mas não houve efeito do treinamento [$X^2(1) = 0,014$, $p = 0,904$] e de nenhuma das interações.

Em relação a homecage, após o post Hoc de Bonferroni, foi possível observar que ocorreu diminuição na frequência do tempo de permanência na zona central dos animais isolados em comparação aos agrupados (Bonferroni $p < 0,001$) [isolados: $24,3 \pm 1,27$; agrupados: $30,7 \pm 1,28$].

Em relação ao consumo após o post Hoc de Bonferroni, foi possível observar que ocorreu diminuição na frequência do tempo de permanência na zona central dos animais que consumiram ETOH em comparação aos controles (Bonferroni $p=0,004$) [etanol: $24,9 \pm 1,21$; controle: $30,1 \pm 1,34$].

Figura 53. Gráfico da frequência do tempo de permanência na zona central. *Diminuição no tempo de permanência na zona central pelos animais isolados quando comparados aos agrupados. #Diminuição no tempo de permanência na zona central pelos animais que consumiram etanol em comparação aos controles.



Em relação às medidas do campo aberto, observou-se que o fator isolamento e consumo de etanol diminuiu o número de permanência na zona central, indicando aumento na ansiedade nesses animais (efeito ansiogênico).

Dos conjuntos dos dados apresentados aqui e nos materiais suplementares, observa-se que o exercício físico diminuiu o número de entradas total (material suplementar) e o número de frequência de entradas nos braços abertos e, como este é considerado como uma região aversiva, esses dados podem ser indicativos de um possível comportamento tipo ansioso.

Em relação às medidas de avaliação de risco, observou-se que exercício físico promoveu diminuição nos números de esticadas e mergulhos desprotegidos. Como esse comportamento é realizado em uma área considerada hostil para o animal e indicam um parâmetro de exploração, esses dados indicam possível aumento no comportamento tipo ansioso.

Em relação às medidas no campo aberto, observou-se que o fator isolamento e consumo de etanol diminuiu o número de permanência na zona central, indicando um efeito ansiogênico nesses animais.

Em conjunto esses dados mostram que a exposição dos animais ao estresse de isolamento e/ou etanol e/ou exercício promoveram possível efeito ansiogênico nos camundongos durante a abstinência protraída de etanol.

4.3 Quantificação do tempo de exploração dos objetos no teste de Reconhecimento de objeto (ROte)

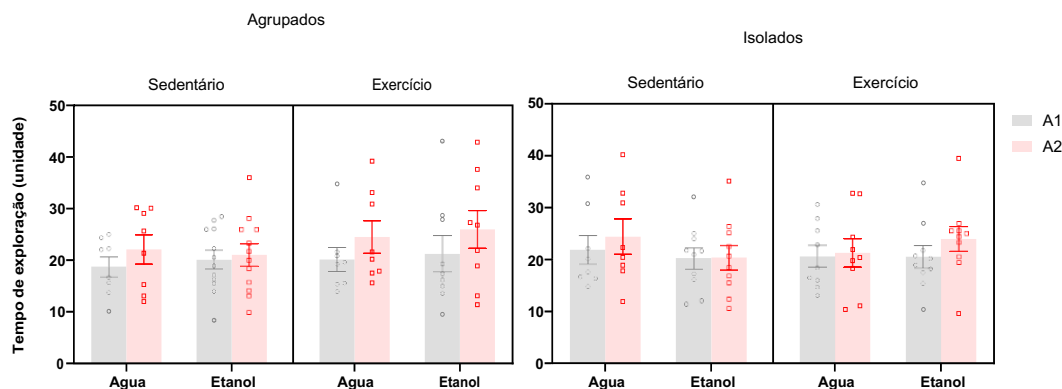
- Habituação (A1 e A2):

Para comparar o tempo de exploração entre os objetos A1 e A2, apresentados na figura 54(A) realizamos o GzLM com distribuição Gamma (AIC =1017,46) que mostrou que não houve efeito no tempo de exploração entre os objetos [$X^2(1) = 3,75$, $p = 0,053$], consumo [$X^2(1) = 2,32 \times 10^{-4}$, $p = 0,988$], homecage [$X^2(1) = 0,008$, $p = 0,928$] e treinamento [$X^2(1) = 0,89$, $p = 0,344$]. Além disso, não foram encontradas diferenças nas interações entre os fatores.

Em relação à porcentagem do tempo de exploração para a habituação (%TE1), a distribuição que aderiu melhor aos dados foi a Normal (AIC =503,78). Os resultados apresentados na figura 54(B), para (%TE1), mostraram que não houve efeito do homecage [$X^2(1) = 1,62$, $p = 0,202$], do consumo [$X^2(1) = 0,013$, $p = 0,907$], do treinamento [$X^2(1) = 1,15$, $p = 0,282$] e também não houve efeito em nenhuma das interações. Os valores da porcentagem de exploração permaneceram em torno de 50%. Isso indica que os grupos exploraram de forma semelhante os dois objetos (Objeto A1: $20,44 \pm 0,84$ s; Objeto A2: $22,96 \pm 0,95$ s).

Figura 54. (A). Gráfico do tempo de exploração dos objetos na habituação. Nele pode-se observar que não houve efeito dos fatores (homecage, tratamento e treinamento). (B) Gráfico da % tempo de exploração dos objetos na habituação. Nele pode-se observar que não houve efeito dos fatores (homecage, tratamento e treinamento) e como as medidas de tempo ficaram próximas a 50%, exploraram igualmente os dois objetos.

A.



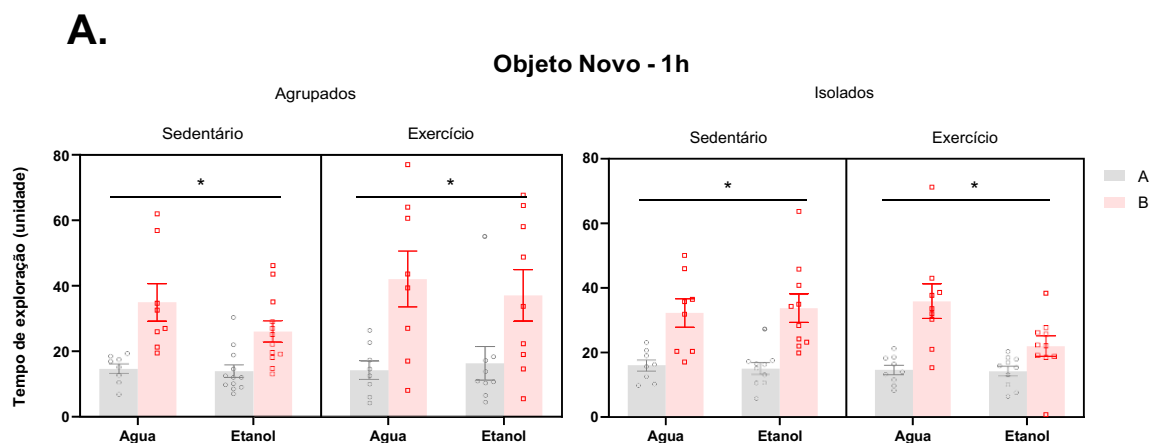
- Teste de 1h (A1 e B):

Para comparar o tempo de exploração entre os objetos A1(obj familiar) e B (obj novo) realizamos o GzLM com distribuição Gamma (AIC =1114,17) que mostrou que houve efeito no tempo de exploração entre os objetos [$X^2(1) = 90,45$, $p < 0,001$], mas não houve efeito em relação ao consumo [$X^2(1) = 3,16$, $p = 0,075$], homecage [$X^2(1) = 0,59$, $p = 0,441$], e treinamento [$X^2(1) = 0,05$, $p = 0,819$]. Não houve interação entre os fatores.

Em relação ao objeto, como apresentado em 55(A) os animais passaram um maior tempo explorando o objeto B independente do consumo, homecage e treinamento (Objeto A1: $15,00 \pm 0,85$ s; Objeto B: $32,73 \pm 1,88$ s).

Em relação à porcentagem do tempo de exploração para o teste de 1h (%TE2), a distribuição que aderiu melhor aos dados foi a Normal (AIC =583,78). Os resultados apresentados na figura 55(B), para (%TE2), mostraram que não houve efeito do homecage [$X^2(1) = 1,74$, $p = 0,186$], do consumo [$X^2(1) = 2,96$, $p = 0,085$], do treinamento [$X^2(1) = 0,001$, $p = 0,972$] e também não houve efeito em nenhuma das interações. Os valores da porcentagem de exploração ficaram acima de 50%. Portanto, os animais exploraram mais o objeto novo B em comparação ao objeto familiar A1.

Figura 55. (A) Gráfico do tempo de exploração dos objetos no teste de 1 hora. Nele pode-se observar que não houve efeito dos fatores (homecage, tratamento e treinamento), apenas do objeto. (B) Gráfico da % tempo de exploração dos objetos no teste de 1 hora. Nele pode-se observar que a porcentagem permaneceu acima de 50%, indicando que os animais exploraram mais o objeto B do que o A1.



- Teste de 24h (A1 e C):

Para comparar o tempo de exploração entre os objetos A1(obj familiar) e C (obj novo) realizamos o GzLM com distribuição Gamma (AIC =1150,95) que mostrou que houve efeito

no tempo de exploração entre os objetos [$X^2(1) = 77,23$, $p < 0,001$], e interação entre homecage*objeto [$X^2(1) = 6,07$, $p = 0,014$]. Não houve efeito em relação ao consumo [$X^2(1) = 1,71$, $p = 0,190$], homecage [$X^2(1) = 2,89$, $p = 0,089$], treinamento [$X^2(1) = 1,27$, $p = 0,259$], nem para as demais interações.

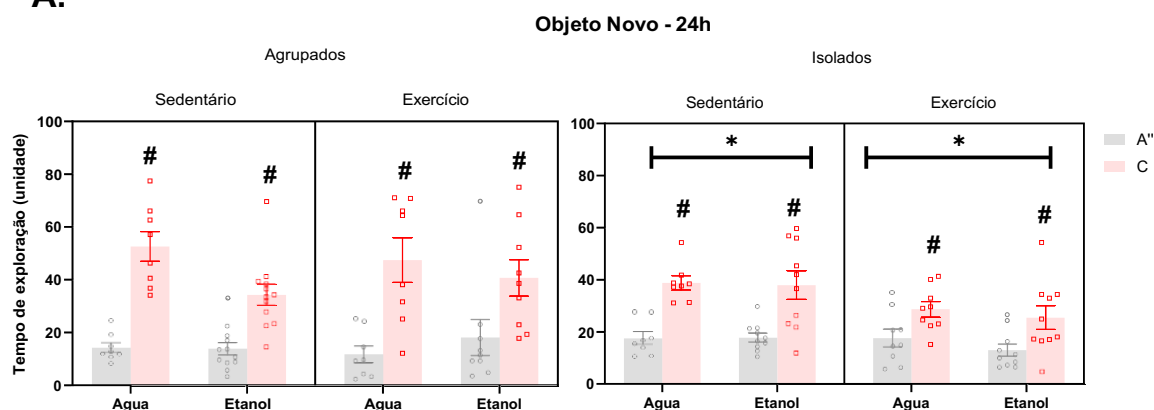
Em relação ao objeto, como apresentado na figura 56(A), os animais passaram um maior tempo explorando o objeto C independente do consumo, home case e treinamento (Objeto C: $38,23 \pm 2,49$ s; Objeto A1: $15,47 \pm 0,98$ s). Portanto, os animais exploraram mais o objeto novo C em comparação ao objeto familiar A1. Em relação à interação, os animais do grupo isolados apresentaram um menor tempo de exploração no objeto novo (C) quando comparado aos animais agrupados [Objeto A1 (Agrupados: $14,47 \pm 1,29$ s; Isolados: $16,48 \pm 1,47$ s) Objeto C (Agrupados: $43,72 \pm 4,02$ s; Isolados: $32,74 \pm 2,95$ s)].

Em relação à porcentagem do tempo de exploração para o teste de 24h (%TE3), a distribuição que aderiu melhor aos dados foi a Normal (AIC =609,05). Os resultados apresentados na figura 56(B), para (%TE3), mostraram que houve efeito do homecage [$X^2(1) = 10,09$, $p = 0,001$], mas não houve efeito do consumo [$X^2(1) = 2,36$, $p = 0,124$], do treinamento [$X^2(1) = 0,076$, $p = 0,783$] e também não houve efeito em nenhuma das interações.

Em relação à homecase, após o post Hoc de Bonferroni, foi possível observar que ocorreu uma diminuição no tempo de exploração entre os animais isolados quando comparado aos sociáveis (Bonferroni $p = 0,002$) [Isolado: $65,5 \pm 2,29$; Agrupados: $75,9 \pm 2,32$]. Portanto independente do consumo e treinamento, os animais isolados apresentaram uma diminuição no tempo de exploração do objeto novo.

Figura 56. (A) Gráfico do tempo de exploração dos objetos no teste de 24 horas. Nele pode-se observar que não houve efeito dos fatores tratamento e treinamento. * Diminuição no tempo de exploração entre os animais isolados quando comparado aos Agrupados. #Aumento no tempo de exploração no objeto C em relação ao objeto A1. (B) Gráfico da % tempo de exploração dos objetos no teste de 24 horas. Nele pode-se observar que a porcentagem permaneceu acima de 50%, indicando que os animais passaram mais tempo explorando o objeto C do que o objeto A1.

A.



Em relação às medidas de exploração do objeto novo observou-se que os fatores não alteraram a desempenho cognitivo (reconhecimento foi preservado) em nenhum dos testes realizados. Entretanto torna-se interessante observar que os animais mantidos em isolamento, no teste de 24 horas, apresentaram um padrão de exploração diferente, pois diminuíram o tempo de exploração total dos objetos quando comparados aos agrupados. Isso pode ser um indicativo de baixa motivação em explorar o ambiente, com o surgimento do estado de apatia.

4.4 Quantificação do número total de quedas no RotaRod (RRnq)

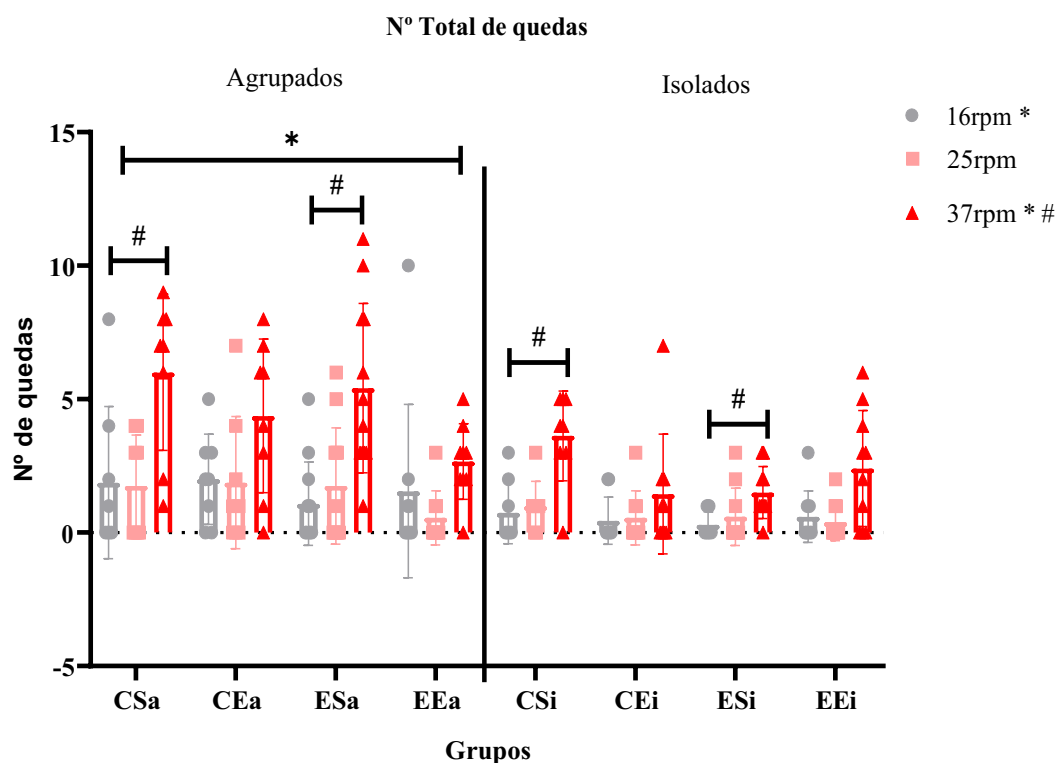
Em relação ao número de quedas na velocidade 16rpm, a distribuição que melhor aderiu aos dados foi a Binomial negativa (AIC =211,34). Os resultados apresentados na figura 57, para número de quedas mostraram que houve efeito do homecage [$X^2(1) = 9,35$; $p = 0,002$], mas não houve efeito do consumo [$X^2(1) = 0,8362$, $p = 0,360$], do treinamento [$X^2(1) = 0,147$, $p = 0,701$] e nem interações. Em relação à homecage, após o post Hoc de Bonferroni, foi possível observar que ocorreu um aumento no número de quedas entre os animais do grupo Agrupado quando comparado ao grupo isolado ($\beta = 3,20$; Bonferroni $p = 0,003$) [Agrupado: $1,58 \pm 0,37$; Isolado: $0,495 \pm 0,152$].

Em relação ao número de quedas na velocidade 25rpm, a distribuição que melhor aderiu aos dados foi a Binomial negativa (AIC =214,34). Os resultados apresentados na figura 57, para número de quedas, mostraram que não houve efeito da homecage [$X^2(1) = 4,82$; $p = 0,028$], do consumo [$X^2(1) = 2,01$; $p = 0,156$], do treinamento [$X^2(1) = 2,04$; $p = 0,152$] e nem interações.

Em relação ao número de quedas na velocidade 37rpm, a distribuição que melhor aderiu aos dados foi a Poisson (AIC =330,61). Os resultados apresentados na figura 57, para número

de quedas, mostraram que houve efeito do homecage $X^2(1) = 30,09$; $p < 0,001$] e do treinamento [$X^2(1) = 10,51$, $p = 0,001$], mas não houve efeito do consumo [$X^2(1) = 4,026$; $p = 0,045$] e das interações. Em relação à homecage, após o post Hoc de Bonferroni, foi possível observar que ocorreu um aumento no número de quedas entre os animais do grupo Agrupado quando comparado ao grupo isolado (Bonferroni $p < 0,001$) [Sociável: $4,61 \pm 0,35$; Isolado: $2,24 \pm 0,250$]. Em relação ao treinamento, após o post Hoc de Bonferroni, foi possível observar que ocorreu aumento no número de quedas entre os animais do grupo sedentário quando comparado ao grupo exercício (Bonferroni $p = 0,001$) [Sedentário: $4,14 \pm 0,33$; Exercício: $2,72 \pm 0,279$].

Figura 57. Gráfico do número de quedas no teste RotaRod. Nele pode-se observar que não houve efeito dos fatores (homecage, tratamento e treinamento) na velocidade de 25rpm. *Aumento no número de quedas entre os animais do grupo Agrupado quando comparado ao grupo isolado, nas velocidades 16rpm e 37rpm. # Aumento no número de quedas entre os animais do grupo sedentário quando comparado ao grupo exercício na velocidade de 37rpm.



Esses resultados indicam que os animais treinados apresentaram um melhor desempenho no teste de coordenação motora quando comparados aos animais sedentários.

4.5 Quantificação dos parâmetros de latência (Glat) e de tempo de Grooming na região dorsal (Gdor) no teste de splash de sacarose

- Tempo de latência para iniciar o *Grooming* (Glat):

Em relação ao tempo de latência do *grooming*, a distribuição que melhor aderiu aos dados foi a Gamma (AIC =814,58). Os resultados apresentados na figura 58 (A), para o tempo de latência mostraram que houve efeito do homecage [$X^2(1) = 9,75$; $p = 0,002$], mas não houve efeito do consumo [$X^2(1) = 2,04$; $p = 0,153$], do treinamento [$X^2(1) = 3,74$; $p = 0,053$] e das interações entre elas.

Em relação à homecage, após o post Hoc de Bonferroni, foi possível observar que ocorreu um aumento no tempo de latência entre os animais do grupo Isolado quando comparado ao grupo agrupado (Bonferroni $p = 0,003$) [Agrupado: $71,7 \pm 9,13$; Isolado: $126 \pm 15,24$].

- Tempo realizando *Grooming* na região dorsal (Glat):

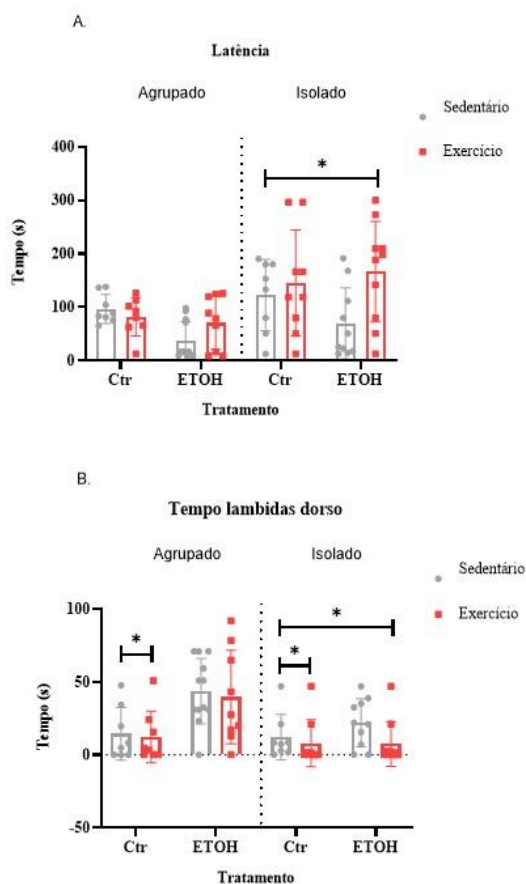
Em relação ao tempo de lambidas no dorso, a distribuição que melhor aderiu aos dados foi a Normal (AIC =663,39). Os resultados apresentados na figura 58(B), para o tempo de latência mostraram que houve efeito do homecage [$X^2(1) = 10,3$; $p = 0,001$] e do consumo [$X^2(1) = 12,26$; $p < 0,001$], mas não houve efeito do treinamento [$X^2(1) = 1,72$; $p = 0,189$] e das interações entre elas.

Em relação à homecage, após o post Hoc de Bonferroni, foi possível observar que ocorreu uma diminuição no tempo de lambidas no dorso entre os animais do grupo Isolado quando comparado ao grupo agrupado (Bonferroni $p = 0,002$) [Agrupado: $27,5 \pm 3,34$; Isolado: $12,3 \pm 3,31$].

Em relação ao consumo, após o post Hoc de Bonferroni, foi possível observar que ocorreu um aumento no tempo de lambidas no dorso entre os animais do grupo etanol quando comparado ao grupo controle/água (Bonferroni $p < 0,001$) [Etanol: $28,1 \pm 3,15$; Controle: $11,7 \pm 3,5$].

Figura 58. **(A)** Gráfico do tempo de latência para iniciar o grooming. Nele pode-se observar que não houve efeito dos fatores (tratamento e treinamento). * Aumento no tempo de latência entre os animais do grupo Isolado quando comparado ao grupo agrupado. **(B)** Gráfico do tempo total de lambidas no dorso. Nele pode-se observar que houve efeito dos fatores homecage e consumo. * Diminuição no tempo de lambidas entre os

animais do grupo isolado quando comparado ao grupo Agrupado. # Diminuição no tempo de lambidas entre os animais do grupo Ctr x etanol.



Em conjunto esses resultados indicam que os animais mantidos em isolamento social estavam em um possível estado de apatia, representado pelo aumento para iniciar o *grooming*, assim como uma diminuição no *grooming* realizado na região dorsal, o que corrobora o item acima que demonstrou que os animais isolados exploraram menos os objetos.

4.6 Quantificação dos parâmetros do Nado forçado (tempo de imobilidade (NFi) e tempo de nado (NFn))

NFi:

Em relação ao tempo de imobilidade, a distribuição que melhor aderiu aos dados foi a Normal (AIC =745,7). Os resultados apresentados na figura 59 (A), para o tempo de imobilidade mostraram que houve efeito do homecage [$X^2(1) = 9,09,46$, $p=0,003$] e do treinamento [$X^2(1) = 9,15$, $p=0,002$], mas não houve efeito do consumo [$X^2(1) = 0,0954$, p

=0,757] e das interações.

Em relação à homecage, após o post Hoc de Bonferroni, foi possível observar que ocorreu um aumento no tempo de imobilidade entre os animais do grupo Agrupado quando comparado ao grupo isolado (Bonferroni $p=0,004$) [Agrupado: $99,6 \pm 5,8$; Isolado: $74,9 \pm 5,78$].

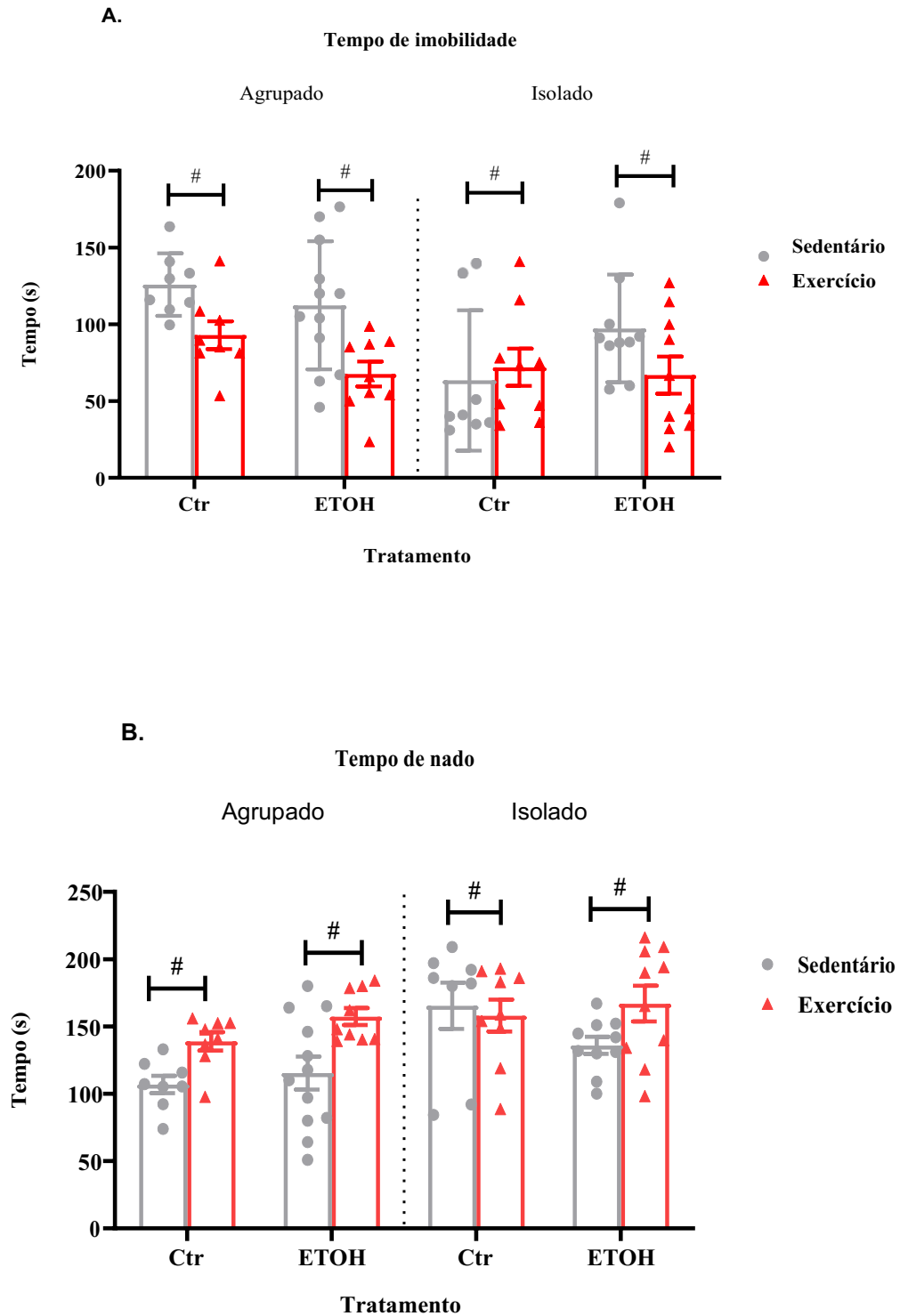
Em relação ao treinamento, após o post Hoc de Bonferroni, foi possível observar que ocorreu aumento no tempo de imobilidade entre os animais do grupo sedentário quando comparado aos animais do grupo exercício (Bonferroni $p=0,004$) [Sedentário: $99,7 \pm 5,76$; Exercício: $74,8 \pm 5,85$].

NFn:

Em relação ao tempo de nado, a distribuição que melhor aderiu aos dados foi a Normal (AIC =738,7). Os resultados apresentados na figura 59 (B), para o tempo de nado mostraram que houve efeito do homecage [$X^2(1) = 11,79$, $p < 0,001$] e do treinamento [$X^2(1) = 9,77$, $p = 0,002$], mas não houve efeito do consumo [$X^2(1) = 0,0954$, $p = 0,757$] e das interações.

Em relação à homecage, após o post Hoc de Bonferroni, foi possível observar que ocorreu um aumento no tempo de nado entre os animais do grupo Isolado quando comparado ao grupo agrupado (Bonferroni $p=0,001$) [Agrupado: $130 \pm 5,56$; Isolado: $157 \pm 5,51$]. Em relação ao treinamento, após o post Hoc de Bonferroni, foi possível observar que ocorreu aumento no tempo de nado entre os animais do grupo exercício quando comparado aos animais do grupo sedentário (Bonferroni $p=0,003$) [Sedentário: $131 \pm 5,49$; Exercício: $155 \pm 5,58$].

Figura 59. (A) Gráfico do tempo de imobilidade no nado forçado. Nele pode-se observar que não houve efeito do consumo. # Diminuição no tempo de imobilidade entre os animais do grupo exercício quando comparado aos animais do grupo sedentário. (B). Gráfico do tempo de nado no teste do nado forçado. Nele pode-se observar que houve efeito do homecage e do consumo. # Aumento no tempo de nado entre os animais do grupo exercício quando comparado aos animais do grupo sedentário.



Em conjunto esses dados indicam que os animais sedentários, independente da homecage, estavam em um possível estado apático, o qual foi representado pelo aumento no tempo de imobilidade.

ETAPA 5: Verificação das alterações nas expressões das proteínas LC3-I/ II, p62, m-TORC1 e BDNF entre os oito grupos experimentais.

5.1 Expressão LC3-I, LC3-II, p62 e GAPDH no hipocampo:

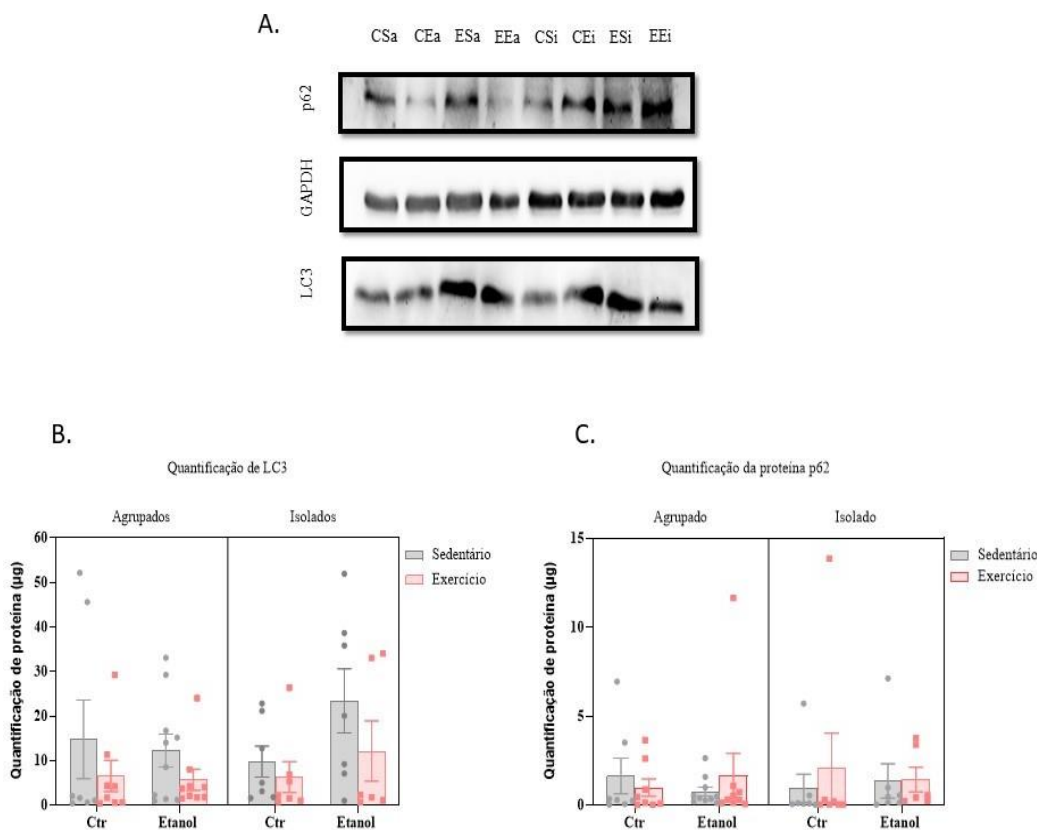
Analisando a expressão da proteína LC3-I e II através da técnica de *western blotting*, representada na figura 60 (A), não foi possível quantificar a taxa de conversão entre a LC3-I/LC3-II, pois as bandas referentes à LC3-II não foram identificadas. Dessa forma, quantificou-se os valores totais da LC3-I e estes valores foram comparados entre os diferentes tratamentos.

Ao adicionar todas as variáveis no modelo Gamma (AIC =418,91) os resultados mostraram que não houve efeito: de homecage [$X^2(1)=0,58$, $p=0,444$], consumo [$X^2(1)=0,98$, $p=0,321$], treinamento [$X^2(1)=3,07$, $p=0,080$], assim como não houve efeito de interação entre os fatores homecage*consumo [$X^2(1)=2,25$, $p=0,133$], homecage*treinamento [$X^2(1)=3,20 \times 10^{-5}$, $p=0,995$], consumo*treinamento [$X^2(1)=0,13$, $p=0,708$] e homecage*consumo*treinamento [$X^2(1)=0,34$, $p=0,557$].

Em relação a expressão da proteína p62, representada na figura 60 (C), ao adicionar todas as variáveis no modelo Gamma (AIC =285,27) não encontramos efeito de homecage [$X^2(1)=0,07$, $p=0,784$], consumo [$X^2(1)=0,02$, $p=0,878$], treinamento [$X^2(1)=0,26$, $p=0,606$], e interação entre os fatores homecage*consumo [$X^2(1)=1,15 \times 10^{-4}$, $p=0,991$], homecage*treinamento [$X^2(1)=0,11$, $p=0,735$], consumo*treinamento [$X^2(1)=0,03$, $p=0,858$] e homecage*consumo*treinamento [$X^2(1)=0,83$, $p=0,361$].

Figura 60. (A) Imagem representativa das bandas de expressão das proteínas LC3-I, p62 e GAPDH. (B) Gráfico da expressão da proteína LC3-I nos diferentes grupos experimentais (isolado/ Agrupado. Etanol/controle

e exercício/sedentário). (C) Gráfico da expressão da proteína p62 nos diferentes grupos experimentais (isolado/ Agrupado. Etanol/control e exercício/sedentário). Não houve efeito dos fatores na expressão dessas proteínas.



A interpretação dos valores da expressão das proteínas LC3-I e p62, em conjunto, demonstra que no momento em que as amostras foram coletadas e analisadas não estava ocorrendo a formação do autofagossomo. Isso pode ser indicativo de que a via da autofagia, para degradação de organelas, não estava ativada.

5.2 Razão p-mTORC1/t-mTORC1 no hipocampo:

Em relação à razão da proteína p-mTORC1/t-mTORC1, a distribuição que melhor aderiu aos dados foi a Gamma (AIC = -44,46). Os resultados apresentados na figura 61(A e B) mostraram que não houve efeito do homecage [$X^2(1) = 1,55$, $p = 0,213$], consumo [$X^2(1) = 0,27$, $p = 0,601$], do treinamento [$X^2(1) = 0,798$, $p = 0,372$] e também não houve efeito em nenhuma das interações.

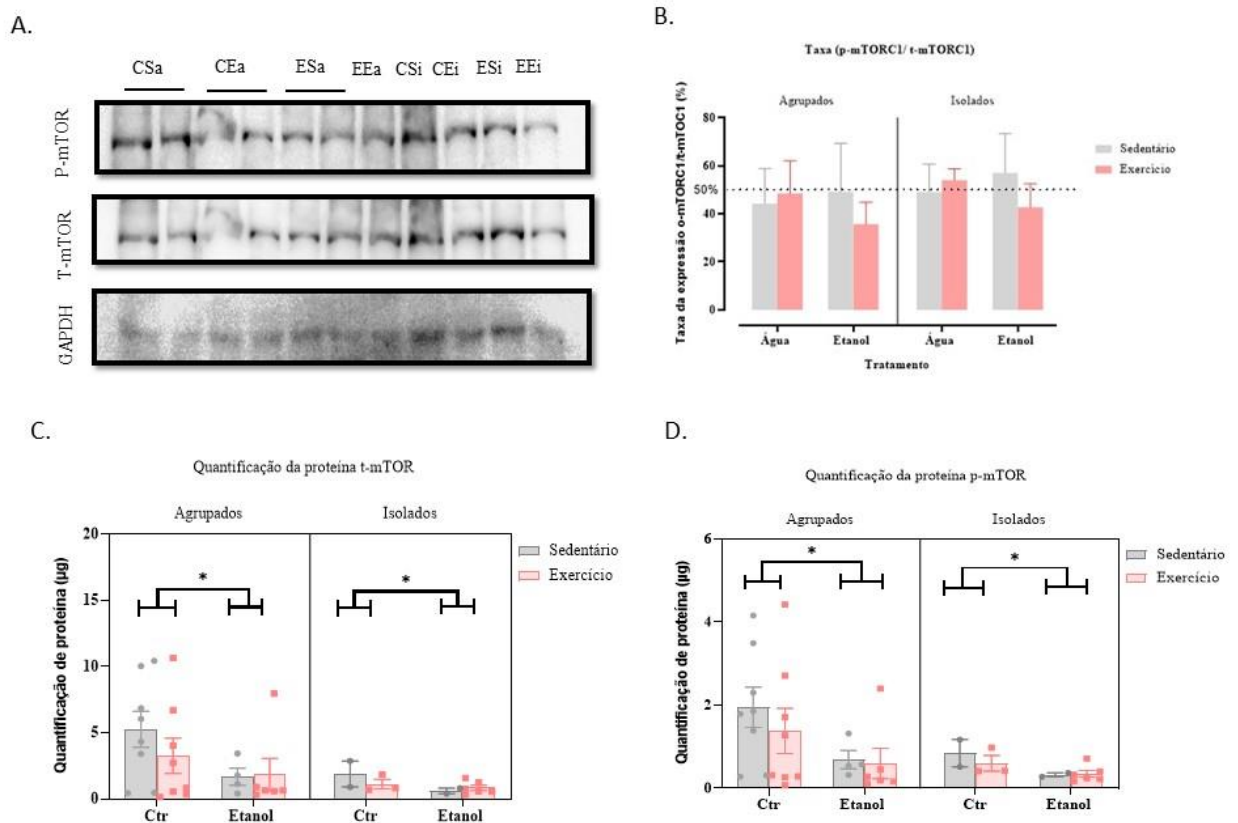
Em relação à expressão da proteína t-mTORC1, representada na figura 83 (C), ao adicionar todas as variáveis no modelo Gamma (AIC = 151,17), observou-se apenas efeito do fator consumo [$X^2(1) = 5,07$, $p = 0,024$]. Não houve efeito de homecage [$X^2(1) = 3,04$, $p = 0,081$],

treinamento [$X^2(1) = 0,72$, $p = 0,395$], e interação entre os fatores homecage*consumo [$X^2(1) = 1,13$, $p = 0,286$], homecage*treinamento [$X^2(1) = 0,19$, $p = 0,655$], consumo*treinamento [$X^2(1) = 1,25$, $p = 0,262$] e homecage*consumo*treinamento [$X^2(1) = 0,15$, $p = 0,696$]. Os animais que consumiram etanol apresentaram uma menor expressão de t-mTORC1 quando comparado aos animais do grupo controle (Etanol $1,24 \pm 0,30$ μg ; Ctr: $2,88 \pm 0,66$ μg). Portanto, independente da homecage ou da prática de atividade física, os animais do grupo etanol apresentaram menor expressão de t-mTORC1 no hipocampo.

Em relação à expressão da proteína p-mTORC1, representada na imagem 83 (D), ao adicionar todas as variáveis no modelo Gamma (AIC =78,14), observou-se apenas efeito do fator consumo [$X^2(1) = 5,77$, $p = 0,016$]. Não houve efeito de homecage [$X^2(1) = 2,63$, $p = 0,104$], treinamento [$X^2(1) = 0,65$, $p = 0,417$], e interação entre os fatores homecage*consumo [$X^2(1) = 1,05$, $p = 0,305$], homecage*treinamento [$X^2(1) = 0,14$, $p = 0,700$], consumo*treinamento [$X^2(1) = 0,46$, $p = 0,497$] e homecage*consumo*treinamento [$X^2(1) = 0,03$, $p = 0,854$].

Os animais que consumiram etanol apresentaram uma menor expressão de p-mTORC1 quando comparado aos animais do grupo controle (Etanol $0,49 \pm 0,11$ μg ; Ctr: $1,19 \pm 0,2$ μg). Portanto, independente da homecage ou da prática de atividade física, os animais do grupo etanol apresentaram menor expressão de p-mTORC1 no hipocampo.

Figura 61. (A) Imagem representativa das bandas de expressão das proteínas p-mTOR e t-mTOR. (B) Gráfico da taxa de fosforilação da proteína mTORC1 nos diferentes grupos experimentais (isolado/ Agrupado. Etanol/control e exercício/sedentário). Não teve diferença entre os grupos em nenhum tratamento. (C) Gráfico da expressão da proteína t-mTORC1 nos diferentes grupos experimentais (isolado/ Agrupado. Etanol/control e exercício/sedentário). (D) Gráfico da expressão da proteína p-mTORC1 nos diferentes grupos experimentais (isolado/ Agrupado. Etanol/control e exercício/sedentário). *Diminuição da expressão no grupo etanol em relação ao controle.



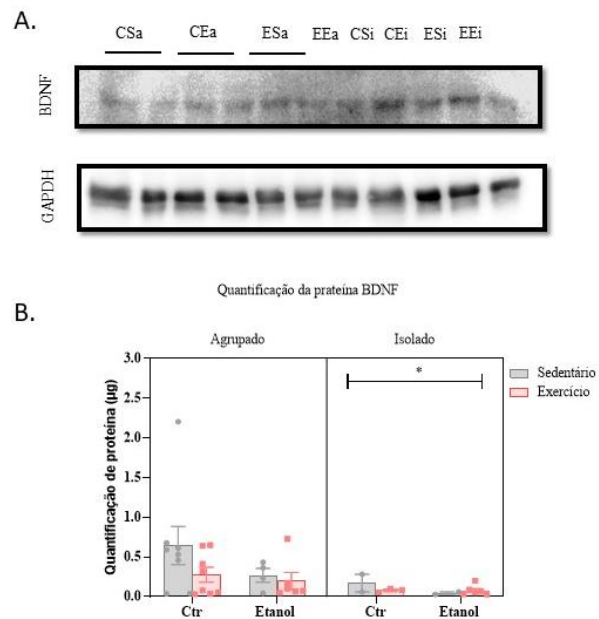
5.3 Expressão de BDNF no hipocampo

Ao adicionar todas as variáveis no modelo Gamma (AIC=30,39), os resultados mostraram que houve efeito apenas de homecage [$X^2(1)=8,06$, $p=0,035$]. Não houve efeito de consumo [$X^2(1) = 3,11$, $p = 0,077$], treinamento [$X^2(1) = 2,83$, $p = 0,092$], e interação entre os fatores homecage*consumo [$X^2(1) = 0,73$, $p = 0,391$], homecage*treinamento [$X^2(1)=1,14$, $p=0,284$], consumo*treinamento [$X^2(1)=1,94$, $p=0,163$] e homecage*consumo*treinamento [$X^2(1) = 0,30$, $p = 0,584$].

Dentro do fator homecage foi observado que os animais isolados apresentaram uma

menor expressão de BDNF quando comparado aos animais Agrupados (Agrupado $0,34 \pm 0,07 \mu\text{g}$; Isolado: $0,09 \pm 0,03 \mu\text{g}$), representados na figura 62 (B). Esse resultado indica que, independentemente da substância consumida ou do exercício físico, os animais agrupados apresentaram maior expressão de BDNF no hipocampo.

Figura 62. (A) Imagem representativa das bandas de expressão das proteínas BDNF e GAPDH. (B) Gráfico da expressão da proteína BDNF. *Diminuição da expressão de BDNF nos animais isolados, independentemente do consumo e treinamento, em relação aos agrupados.



O estresse do isolamento social diminuiu a expressão do BDNF. A análise desse resultado, realizada em conjunto com os dados dos comportamentos tipo ansioso, estado apático condizente com possível surgimento do transtorno tipo depressivo e valores brutos da expressão proteica de t-mTORC1 e p-mTORC1 podem sugerir que os animais que passaram pelo isolamento social e/ou consumiram etanol e/ou realizaram exercício físico apresentam, de uma forma geral, problemas na plasticidade e sintomas tipo depressivos.

6. DISCUSSÃO

No presente trabalho buscamos investigar as alterações moleculares e comportamentais promovidas pelo exercício físico, durante a fase de abstinência protraída, em camundongos que passaram pela intoxicação ao etanol durante a adolescência. Na tabela 7 encontram-se o resumo dos principais resultados de nossos três experimentos.

Tabela 7. Imagem representativa dos nossos principais resultados.

	RESULTADOS PRINCIPAIS		
	EXP1	EXP2	EXP3
Tipo de Consumo	IP salina x IP etoh	IA2BC + (Vapor x aR)	IA2BC + Vapor (Isolado x Agrupado)
Resultados principais dos diferentes tipos de intoxicação		* Consumo de etanol do grupo VAPOR aumentou na semana 3, 5 e 7 quando comparado ao grupo AR. # Consumo de etanol aumentou ao longo das semanas 5 e 7 em relação à semana 3 no grupo VAPOR.	# Aumento no consumo de etanol do grupo ISOLADO, em relação ao agrupado, na semana 5.
		*Diminuição do consumo de líquidos logo após vapor	*Diminuição do consumo de líquidos logo após vapor. #Vapor de etanol igualou consumo entre diferentes homecages.
Velocidade	Aumento na velocidade final dos animais do grupo exercitado em relação aos sedentários.	Aumento na velocidade final dos animais do grupo exercitado em relação aos sedentários.	Aumento na velocidade final dos animais do grupo exercitado em relação aos sedentários.
Molecular	*CRF: etanol e exercício aumentaram expressão # CRF-BP: etanol aumentou expressão	Não houve alteração na expressão das células da glia	BDNF, p-mTOR e t-mTOR: diminuição devido ao isolamento e etanol
Comportamento			Ansiedade: Exercício físico promoveu aumento no comportamento tipo ansioso nos animais exercitados quando comparados aos sedentários.
			Memória: Diminuição da exploração do objeto novo no teste de 24h
			RotaRod: aumento no número de quedas no grupo sedentário
			Depressão/anedonia: <u>Teste NF</u> : *Aumento no tempo de imobilidade nos animais agrupados. # Aumento no tempo de imobilidade entre os animais do grupo sedentário. <u>Teste de splash de sacarose</u> : * Aumento no tempo de latência entre os animais isolados. # Diminuição no tempo de lambidas entre os animais do grupo isolado

6.1 EXPERIMENTO 1: INVESTIGAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA CRFérgico (CRF, CRFR1 E CRF-BP) DO HIPOCAMPO DORSAL APÓS A PRÁTICA DO EXERCÍCIO FÍSICO DURANTE A ABSTINÊNCIA PROTRAÍDA, NOS ANIMAIS ADOLESCENTES INTOXICADOS E/OU NÃO POR ETANOL”

Este estudo foi desenhado com o objetivo de identificar alterações promovidas na expressão dos genes CRF, CRF1 e CRF-BP, pelo exercício físico forçado e/ou pela intoxicação crônica por etanol, durante a fase da abstinência protraída, em camundongos *Swiss* adolescentes.

Em relação aos efeitos fisiológicos do exercício físico, nossos resultados mostraram que após o período de treinamento observou-se melhora no desempenho aeróbico dos animais treinados, CE e EE, quando comparados aos animais sedentários, CS e ES. Esses resultados estão de acordo com a literatura e foram mostrados através do aumento na velocidade de corrida no teste de esforço máximo. Por exemplo, Kim e colaboradores (2020), em seu estudo comparativo entre os efeitos da corrida forçada e voluntária em camundongos C57BL/6, observaram que os dois tipos de exercício resultaram, de uma forma geral, aumento no desempenho aeróbico, através do aumento da distância e da velocidade percorrida por esses animais (KIM et al., 2020).

Para a segunda etapa, o objetivo foi identificar as alterações promovidas pelo exercício físico forçado e/ou pela intoxicação de etanol, durante a abstinência protraída, na expressão dos genes CRF, CRF1 e CRF-BP de camundongos *Swiss*. Levantamos a hipótese de que a intoxicação crônica ao etanol, durante a primeira fase da adolescência, promoveria alterações na expressão dos genes do CRF, CRF1 e CRF-BP durante a fase da abstinência protraída e, de forma contrária, o exercício físico promoveria a normalização na expressão desses genes.

Verificamos que a expressão gênica de mRNA do CRF e da CRF-BP permaneceu aumentada no grupo etanol, na fase da abstinência protraída, quando comparado aos grupos controle; no entanto, contrário ao esperado, não detectamos diferença na expressão do gene CRF1. Também contrário à nossa hipótese, observamos que o exercício físico, quando associado à fase de abstinência ao etanol, promoveu aumento mais pronunciado na expressão desses genes, como representado pelos animais do grupo EE.

A fase de abstinência protraída, por sua vez, é relacionada ao aumento na reatividade às emoções negativas como ansiedade e depressão, assim como a hiper-reatividade do sistema CRFérgico frente a fatores estressantes (KOOB, 2010a; MANDYAM, 2013a; MARTY et al.,

2020b). Por exemplo, Criado e colaboradores (2011) mostraram que os ratos intoxicados com etanol, quando na abstinência aguda (24 horas) não apresentaram alteração na expressão de CRF, no entanto na abstinência protraída (2 semanas) apresentaram aumento na expressão de CRF quando comparado ao grupo controle. Da mesma maneira, Simon e colaboradores (2023) verificaram que os níveis de expressão gênica do mRNA do CRF de camundongos C57BL/6j estavam aumentados tanto na fase de intoxicação ao etanol, quanto na fase de abstinência (SIMON et al., 2023b) quando comparados aos grupos controles.

Um estudo demonstrou também que a administração crônica de etanol promoveu aumento da expressão do gene do CRF e CRF-BP no hipotálamo. De forma contrária, alguns estudos mostram que a administração de etanol promoveu diminuição na expressão de CRF (CRIADO et al., 2011a; LEE et al., 2001). Por exemplo, Lee e colaboradores (2000) mostram diminuição na expressão de CRF e CRFR1, no hipotálamo de ratos que consumiram etanol cronicamente (LEE et al., 2000).

Diferenças no protocolo e nas estruturas analisadas podem justificar as diferenças entre os nossos resultados e os encontrados por Lee e colaboradores (2006). Nos estudos realizados por Lee et al., (2006), a intoxicação através do modelo de injeção intraperitoneal foi feita durante apenas 3 dias e a intoxicação pelo vapor de etanol, por 6 dias. Além disso, Lee e colaboradores (2000) fizeram as análises da expressão gênica de CRF durante a fase aguda da abstinência, enquanto o presente estudo, assim como o realizado por Criado e colaboradores (2011) promoveram a intoxicação ao etanol de forma crônica e as análises de expressões gênicas foram realizadas durante a abstinência protraída (CRIADO et al., 2011b; LEE et al., 2000).

Os efeitos subjacentes da administração de etanol no hipocampo são complexos: pequenas doses podem melhorar o funcionamento do hipocampo, promovendo o fortalecimento sináptico e liberação de glutamato, enquanto que a administração crônica pode resultar na redução de espinhos dendríticos, promovendo déficits na memória (VANDAEL et al., 2021).

Estudos também demonstraram que a sinalização do receptor CRF1 está envolvido nos comportamentos relacionados à busca pelo etanol induzida pelo estresse. Por exemplo, Zorilla e colaboradores (2013) demonstraram que ao bloquear o receptor CRF1 reduziu-se a ingestão de etanol em ratos. Da mesma maneira, Roberto e colaboradores (2010) demonstraram que a administração de antagonista do receptor CRF1(R121919) bloqueou o aumento nos comportamentos de busca pelo etanol induzidos pela abstinência em ratos dependentes e não dependentes (ROBERTO et al., 2010; ZORRILLA et al., 2013).

Neste presente experimento não foi verificado alteração na expressão do gene CRF1, apesar de dados da literatura demonstrarem o contrário. Por exemplo, Simon e colaboradores (2023) mostraram que o consumo de etanol promoveu aumento nos níveis de CRF e nos receptores CRF1 e CRF2 em camundongos C57BL/6j, tanto na intoxicação quanto na abstinência (SIMON et al., 2023b).

No hipocampo, os aumentos dos níveis do CRF podem ser compensados através de mecanismos de regulação pós-transducionais, os quais reduzem a síntese proteica desse fator, assim como na diminuição da atividade funcional de seu receptor CRF1, impedindo que ocorra uma resposta exacerbada ao CRF (MARTY et al., 2020c). Por exemplo, Marty (2020) mostrou que a desregulação hormonal provocada pelo uso crônico de etanol e pelo estresse repetitivo promoveram diminuição da função do CRF1 através de redução na atividade funcional desse receptor (MARTY et al., 2020c).

Os trabalhos relacionados com a função da CRF-BP na modulação de recompensa e na modulação ao estresse ainda são incertos, entretanto sabe-se que essa proteína é altamente expressa no hipocampo e possui função importante em limitar a biodisponibilidade do CRF e a sua ligação ao receptor CRF1 (POTTER et al., 1992). Por exemplo, Haass-Koffler e colaboradores (2016) mostraram que a regulação negativa da CRF-BP diminuiu a autoadministração de etanol (HAASS-KOFFLER et al., 2016). Da mesma forma, Herringa e colaboradores (2006) mostraram que anormalidades nessa proteína foram observadas em pacientes com depressão (HERRINGA; ROSEBOOM; KALIN, 2006).

Nosso experimento mostrou que a abstinência protraída decorrente do uso crônico de etanol aumentou a expressão dessa proteína. Da mesma forma, Erb e colaboradores (2004) também mostraram que durante a fase da abstinência protraída ocorreu aumento na expressão da CRF-BP (ERB et al., 2004). De forma contrária, Ketchesin (2016) mostrou que ciclos repetidos de consumo tipo *binge* de etanol reduziu a expressão da CRF-BP em camundongos C57BL/6j (KETCHESIN; STINNETT; SEASHOLTZ, 2016). Apesar de apresentarem diferenças metodológicas em relação à região do SNC que foram analisadas e ao tipo de substância de abuso que foram utilizadas, parece que o papel da CRF-BP depende do contexto em que se expressa e, nesse sentido, hipotetizamos que o aumento da expressão de CRF-BP no HIP pode estar relacionado ao seu papel inibitório após a ligação a esse neurotransmissor, prevenindo uma resposta exacerbada a abstinência de etanol (LOMBARDO et al., 2001).

O exercício físico é conhecido na literatura pela sua capacidade de melhorar a função encefálica, influenciando tanto na função cognitiva como no humor. Em relação ao hipocampo,

acredita-se que o exercício físico promova indução nos processos da neurogênese, plasticidade sináptica e neurotrofinas (VAN PRAAG, 2008). Por exemplo, Timofeera e colaboradores (2003) mostraram que o exercício físico de alta intensidade induziu aumento na expressão gênica de CRF (TIMOFEEVA; HUANG; RICHARD, 2003). Da mesma forma, Saito e Soya (2004) demonstraram que o exercício físico de alta intensidade aumentou a atividade de neurônios CRFérgicos, mas o mesmo não foi observado durante o exercício físico de baixa intensidade (SAITO; SOYA, 2004).

Esses resultados, em conjunto, mostraram que os ciclos de intoxicação crônica ao etanol, administrado de forma intraperitoneal durante a adolescência, promoveram alterações fisiológicas e neurológicas duradouras, as quais permanecem mesmo durante a fase de abstinência protraída e foram agravadas em decorrência de outros fatores estressantes, como no caso deste estudo, aquele promovido pelo exercício físico forçado.

6.2 EXPERIMENTO 2: “QUANTIFICAÇÃO DO CONSUMO INTERMITENTE VOLUNTÁRIO DE LIVRE ESCOLHA E CARACTERIZAÇÃO QUANTITATIVA DAS CÉLULAS DA GLIA, APÓS A PRÁTICA E/OU NÃO DE EXERCÍCIO FÍSICO DURANTE O PERÍODO DA ABSTINÊNCIA PROTRAÍDA, NOS ANIMAIS QUE FORAM INTOXICADOS OU NÃO POR ETANOL DURANTE A ADOLESCÊNCIA”.

Este estudo foi desenhado com o objetivo de identificar alterações no padrão de consumo voluntário de etanol promovidas por ciclos intermitentes de intoxicação ao vapor de etanol em camundongos adolescentes *Swiss*. Além disso, buscou-se identificar alterações promovidas pelo exercício físico forçado durante a abstinência protraída, após a intoxicação de etanol durante a adolescência, no padrão de expressão de células da glia no hipocampo.

Quanto aos efeitos fisiológicos do exercício físico, nossos resultados estão de acordo com os dados anteriores (experimento 1) que mostraram melhora no desempenho aeróbico dos animais treinados, CE e EE, quando comparados aos animais sedentários, CS e ES, e também corroboram os dados da literatura sobre os efeitos auxiliares do EF na promoção da saúde cardiovascular (MYERS; KOKKINOS; NYELIN, 2019; KIM et al., 2020).

Para a primeira etapa, levantamos a hipótese de que os ciclos intercalados de intoxicação e abstinência, durante a adolescência, promoveriam aumento no consumo de etanol nos camundongos *Swiss*.

Verificamos que os animais submetidos ao protocolo de intoxicação de etanol apresentaram aumento no consumo total dessa substância após todo o protocolo de exposição

aos ciclos de vapor, seguidos do consumo voluntário de etanol, quando comparados aos animais que não foram expostos ao vapor de etanol. Observou-se que nas semanas subsequentes aos ciclos de intoxicação ao vapor de etanol, ocorreu diminuição no consumo dessa substância no IA2BC; entretanto, na segunda semana de IA2BC, o consumo aumentou e foi significativamente maior quando comparado às semanas iniciais e ao consumo dos animais do grupo controle, os quais não passaram pela intoxicação na câmara de vapor.

Esses resultados estão, em parte, de acordo com os dados da literatura, os quais demonstram que a intoxicação alcóolica crônica intercalada com períodos de abstinência fornece motivação para a busca pelo consumo de etanol como um alívio nos sintomas negativos da abstinência (GRIFFIN; LOPEZ; BECKER, 2009; HEILIG et al., 2010b). Por exemplo, Becker e colaboradores (2004) e Carrara-Nascimento e colaboradores (2013) mostraram que camundongos e ratos aumentaram o consumo de etanol após a exposição crônica ao etanol e as experiências repetidas de abstinência (BECKER; LOPEZ, 2004; CARRARA-NASCIMENTO et al., 2013). Da mesma forma, Peregud e colaboradores (2020) mostraram que o consumo de etanol 20%(v/v), no modelo IA2BC, promoveu escalada do consumo dessa substância (PEREGUD; STEPANICHEV; GULYAEVA, 2021).

Surpreendentemente nosso experimento mostrou que inicialmente os ciclos de vapor promoveram diminuição do consumo livre intermitente de etanol, representado pela diminuição do consumo nas semanas subsequentes ao ciclo de vapor. Inferimos que esse padrão diferente de consumo pode estar relacionado à espécie utilizada, assim como as baixas concentrações de BEC (83 – 124mg/dl) encontradas no sangue de nossos animais após a intoxicação na câmara de vapor. Por exemplo, McCool e colaboradores (2015) observaram que camundongos C57BL/6J e DBA/2J apresentaram preferência diferente ao consumo de etanol após passarem por quadros de intoxicação a essa substância (MCCOOL; CHAPPELL, 2015). Da mesma forma, Filder e colaboradores (2012) verificaram que somente após manter a concentração de etanol no sangue dentro dos valores correspondentes aos de intoxicação (>175mg/dL) dos camundongos, estes autoadministraram mais etanol quando comparados aos animais controles (FIDLER et al., 2012a).

Em conjunto, esses dados suportaram a hipótese de que os ciclos de intoxicação pelo vapor de etanol, seguidos de períodos de abstinência, durante a fase da adolescência, podem promover aumento no consumo e na preferência por essa droga (KOOB; VENDRUSCOLO, 2023; WALKER, 2012).

Para a segunda etapa desse experimento, tivemos como objetivo identificar as alterações promovidas pelo exercício físico forçado durante a abstinência protraída na expressão das células da glia de camundongos *Swiss* submetidos à intoxicação crônica ao etanol. Assim levantamos a hipótese de que o etanol promoveria aumento no número de células da glia, em decorrência dos processos inflamatórios, enquanto o exercício físico promoveria a normalização na sua expressão em decorrência da estimulação da liberação de fatores anti-inflamatórios.

Verificamos que os ciclos de intoxicação de etanol, seguidos dos períodos de abstinência protraída, assim como o exercício físico forçado não alteraram o número de micróglias e astrócitos ativados no hipocampo em nenhum grupo experimental (MOFFAT; RON, 2020).

De forma contrária aos nossos resultados, mas corroborando a nossa hipótese, a literatura mostrou que quadros recorrentes de abuso e intoxicação crônica de etanol podem promover aumento da ativação das células da glia (KANE et al., 2013; LOWE et al., 2020). Por exemplo, Conca e colaboradores (2005) mostraram que o uso crônico de etanol aumentou o número de astrócitos reativos, assim como aumento de reatividade do GFAP (GONCA et al., 2005). Da mesma forma, Crews e colaboradores (2008) observaram aumento da imunorreatividade para Iba-1 em humanos dependentes de álcool (HE; CREWS, 2008). Por outro lado, Lundgaard e colaboradores (2018) mostraram que o consumo de etanol pode tanto aumentar quanto diminuir a expressão de GFAP (LUNDGAARD et al., 2018).

Esses dados forneceram evidências indiretas de que a influência na viabilidade celular e na ativação da micróglias e dos astrócitos promovidas pelo consumo de etanol ocorrem de forma dose-dependente, promovendo aumento do processo inflamatório, o qual pode culminar em processos neurodegenerativos, mediados pelas micróglias (BARRY et al., 2008; LACAGNINA; RIVERA; BILBO, 2016), assim como na desregulação do controle das sinapses e das atividades modulatórias dos neurotransmissores, mediados pelos astrócitos (ADERMARK; BOWERS, 2016).

A principal diferença entre os trabalhos citados e o presente estudo encontra-se no tempo entre o último consumo de etanol e a realização da análise histológica. A literatura relata que durante a fase de abstinência protraída pode ocorrer reversão no quadro de neurodegeneração induzida pelo uso crônico de etanol (BARTELS et al., 2007). Dessa forma, hipotetizamos que as alterações nas expressões das células da glia encontradas nesses trabalhos citados decorreram dos efeitos agudos do etanol, enquanto no presente estudo, não encontramos diferenças devido ao longo período de abstinência. Por exemplo, enquanto Conca e colaboradores (2005) e Crews

e colaboradores (2008) realizaram as análises ainda durante o período de consumo de etanol, este presente estudo analisou a ativação das células da glia após 4 semanas de abstinência.

Em relação aos efeitos do exercício físico forçado, também de forma contrária aos nossos resultados, a literatura mostra que este pode melhorar as funções cerebrais e atenuar os processos de neuroinflamação através da regulação da liberação de fatores tróficos e miocinas (MEE-INTA; ZHAO; KUO, 2019). Por exemplo, Van Praag e colaboradores (2008) mostraram que o exercício físico estimulou a proliferação de micróglias em camundongos treinados (VAN PRAAG, 2008). Da mesma forma, Olah e colaboradores (2009) mostraram que o exercício físico favoreceu os estados de vigília das ramificações da micróglia de camundongos treinados (OLAH et al., 2009). Por fim, Xiao e colaboradores (2021) mostraram que o exercício físico suprimiu os fatores inflamatórios e a ativação de células da glia no hipocampo de camundongos que passaram pelo estresse crônico (XIAO et al., 2021).

Estes dados forneceram evidências de que o treinamento pode influenciar a viabilidade celular e o estado de ativação da micróglia e dos astrócitos e que isso ocorre para os diferentes modelos de exercício físico escolhido. Algumas diferenças encontradas entre a literatura e nossos resultados podem ser explicadas devido ao modelo de exercício físico utilizado. Por exemplo, Van Praag e colaboradores (2008) e Olah e colaboradores (2009) utilizaram um protocolo de modelo voluntário enquanto que no presente estudo, os animais foram treinados utilizando o exercício físico forçado de esteira, prevalecendo os efeitos anti-inflamatórios da atividade física (OLAH et al., 2009; VAN PRAAG, 2008; XIAO et al., 2021).

Em relação à intensidade, quando implementado de forma consistente e por períodos mais longos, o exercício físico leva a adaptações mais permanentes, assim como diminui o tempo para a normalização das alterações fisiológicas quando comparado com as atividades agudas (RICE et al., 2023). Em relação ao presente trabalho, todas as coletas biológicas foram realizadas após um longo período de treinamento crônico, o qual pode ter sido suficiente para a normalização e manutenção das possíveis alterações agudas decorrentes dessa prática (ANDERSON; DURSTINE, 2019).

Esses dados, em conjunto, nos mostram que apesar de ter sido realizado a contagem do número de células da glia, para uma melhor compreensão dos efeitos relativos aos efeitos dos ciclos de intoxicação de etanol e do período de realização do exercício físico em nossos animais, seria necessário a complementação dos resultados com as avaliações de modificações epigenéticas e/ou pós-transcricionais (LACAGNINA; RIVERA; BILBO, 2017).

6.3 EXPERIMENTO 3: “ANÁLISE COMPORTAMENTAL E QUANTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS LC3-I, p62, t- e p-m-TOR (total e fosforilada) E BDNF EM UM MODELO DE ASSOCIAÇÃO ENTRE A EXPOSIÇÃO AO ESTRESSE DE ISOLAMENTO SOCIAL E À INTOXICAÇÃO AO VAPOR DE ETANOL DURANTE A ADOLESCÊNCIA E AO EXERCÍCIO FÍSICO DURANTE A ABSTINÊNCIA PROTRAÍDA”.

Este estudo foi desenhado com o objetivo de identificar as alterações promovidas pelo isolamento social no consumo de etanol durante a adolescência. Além disso, objetivou-se identificar as alterações promovidas pelo exercício físico forçado durante a abstinência protraída, nos parâmetros dos comportamentos tipo ansioso, transtorno de humor tipo depressivo, memória, coordenação motora e expressão proteica relacionada à autofagia e plasticidade neural em camundongos *Swiss* submetidos a associação dos efeitos crônicos do isolamento social e consumo de etanol durante a adolescência.

No que se refere aos efeitos fisiológicos do exercício físico, esses dados corroboraram os resultados encontrados nos nossos experimentos anteriores (1 e 2) e mostraram que os animais treinados (CE e EE) tiveram melhora no desempenho aeróbico quando comparados aos animais sedentários (CS e ES) (KIM et al., 2020).

Para a primeira etapa desse experimento, levantamos a hipótese de que o estresse decorrente do isolamento social durante a primeira fase da adolescência seria fator suficiente para promover aumento no consumo livre de etanol, assim como, após a intoxicação crônica ao vapor de etanol seria observado aumento no consumo voluntário de etanol nesses animais.

Verificamos que os animais submetidos ao protocolo de isolamento social apresentaram, em média, aumento no consumo total de etanol ao longo das semanas de consumo voluntário no modelo IA2BC quando comparados aos animais agrupados, sendo esse efeito mais evidente após a quinta semana de isolamento. Observou-se que na semana subsequente ao ciclo de intoxicação ao vapor de etanol ocorreu diminuição no consumo voluntário dessa substância.

Esses resultados estão de acordo com os dados da literatura, os quais demonstraram que durante a primeira fase da adolescência, o isolamento social é considerado como um fator estressante para os roedores e pode promover aumento no consumo de etanol em etapas posteriores do desenvolvimento (RIVERA-IRIZARRY; SKELLY; PLEIL, 2020a; SKELLY et al., 2015b). Por exemplo, Skelly e colaboradores (2015), Caruso e colaboradores (2018) e Wukitsch e colaboradores (2019), mostraram que o isolamento social promoveu o aumento no

consumo voluntário de etanol em camundongos adolescentes (CARUSO et al., 2018b; SKELLY et al., 2015b; WUKITSCH et al., 2019b).

Novamente observamos em nosso experimento que, inicialmente, os ciclos de intoxicação ao vapor de etanol promoveram diminuição do consumo livre intermitente de etanol, representado pela diminuição do consumo no modelo IA2BC na semana subsequente ao ciclo de vapor. Como discutido anteriormente, inferimos que esse padrão diferente de consumo pode estar relacionado à espécie utilizada, assim como às baixas concentrações de BEC (91 – 125mg/dl) encontradas no sangue desses animais após a intoxicação ao etanol na câmara de vapor. Por exemplo, McCool (2015) observou que camundongos C57BL/6J e DBA/2J apresentaram diferenças no consumo de etanol após passarem por quadros de intoxicação a essa substância (MCCOOL; CHAPPELL, 2015). Da mesma forma, Filder (2012) verificou que somente após manter a concentração de etanol no sangue dentro dos valores correspondentes aos de intoxicação, os camundongos autoadministraram mais etanol quando comparados aos animais controles (FIDLER et al., 2012a).

Em conjunto, esses dados suportaram a hipótese de que o estresse promovido pelo isolamento social durante a adolescência é um fator suficiente para aumentar o consumo livre de etanol (KOOB; VENDRUSCOLO, 2023; WALKER, 2012).

Acredita-se que os principais efeitos duradouros causados pelo estresse do isolamento social, da intoxicação ao etanol e do exercício físico forçado ocorrem nos aspectos comportamentais.

Neste contexto, a abstinência protraída tem sido relacionado ao aumento na reatividade às emoções negativas como ansiedade e transtornos de humor tipo depressivo, assim como déficits no aprendizado e processamento de memórias (CRIADO et al., 2011c; KOOB, 2010c; MANDYAM, 2013b; MARTY et al., 2020d).

Para a segunda etapa, levantamos a hipótese de que o estresse do isolamento social associado ao consumo de etanol durante a adolescência promoveria aumento do comportamento tipo ansioso e em estados apáticos e de desespero associados ao transtorno tipo depressivo, assim como prejudicariam a memória discriminativa e a coordenação motora desses animais quando na vida adulta. De forma contrária, o exercício físico forçado promoveria normalização ou redução desses comportamentos alterados.

As alterações nos parâmetros analisados no teste de labirinto em cruz elevado em conjunto com os parâmetros do teste do campo aberto, sugeriram que o protocolo de isolamento

social e/ou consumo de etanol e/ou exercício físico promoveram angiogênese nos animais que foram submetidos a esses tratamentos quando comparados aos seus respectivos controles.

Os dados encontrados em nosso experimento corroboram os estudos da literatura sobre a abstinência protraída do etanol e o surgimento de sintomas associados à ansiedade (BAHJI; CROCKFORD; EL-GUEBALY, 2022; DE SOTO; O'DONNELL; DE SOTO, 1989). Como já bem estabelecido por Wellman (1954), Segal e colaboradores (1970), Kisin (1979) e De Soto e colaboradores (1985 e 1989), foi observado que períodos longos de abstinência (>3 meses) promoveram o surgimento transtornos emocionais como ansiedade.

Os efeitos do isolamento social durante a adolescência nos comportamentos do tipo ansioso em animais adultos, observados no presente estudo, também corroboram outros dados da literatura. Por exemplo, Lander e colaboradores (2017) demonstraram que camundongos isolados por três semanas na fase de pré-adolescência tiveram aumento no comportamento ansiogênico quando comparados aos controles. Da mesma forma, Caruso e colaboradores (2018) observaram que camundongos C57BL/6j adolescentes machos (PND25-PND59), expostos ao modelo de isolamento social crônico variável associado ao consumo de etanol, aumentaram o comportamento tipo ansioso em relação aos controles.

Entretanto a literatura também apresenta resultados conflitantes em relação aos observados em nosso estudo. Por exemplo, Kuniishi e colaboradores (2022) não observaram alteração no comportamento tipo ansioso, na vida adulta (PND63) de camundongos que foram submetidos ao isolamento social durante adolescência. Da mesma forma, Rivera-Irizarry e colaboradores (2020) demonstraram que camundongos adolescentes C57BL/6j machos (PND28), quando submetidos ao isolamento social crônico por 6 semanas, não apresentaram alteração no comportamento tipo ansioso analisados no labirinto em cruz elevado quando na fase adulta (PND70); em contrapartida, os camundongos que foram separados já na idade adulta (PND77) apresentaram aumento no comportamento tipo ansioso após 6 semanas de isolamento (KUNIISHI et al., 2022; RIVERA-IRIZARRY; SKELLY; PLEIL, 2020b).

Pode-se notar que os estudos que relacionam os efeitos do isolamento social com o consumo de etanol apresentam diferenças entre si em relação a execução desses testes de avaliação do comportamento tipo ansioso. Essas diferenças podem ser explicadas pelas diversas metodologias observadas nos delineamentos dos estudos (LANDER; LINDER-SHACHAM; GAISLER-SALOMON, 2017; CARUSO et al., 2018).

Os efeitos do isolamento social e do consumo de etanol nas alterações comportamentais são dependentes da idade em que se inicia o isolamento, sendo esses efeitos mais evidentes

quando a separação ocorre ou na fase pré-púbere ou em fases mais avançadas da adolescência, quando o convívio social é rompido de forma repentina. (CARUSO et al., 2018; LANDER; LINDER-SHACHAM; GAISLER-SALOMON, 2017; RIVERA-IRIZARRY; SKELLY; PLEIL, 2020; WEISMAN et al., 2015).

Além disso, esses efeitos são dependentes do tempo total em que o isolamento perdura. Quando realizado desde a adolescência até a idade adulta de roedores, o isolamento social pode não alterar o estado basal do comportamento tipo ansioso dos animais, ao passo que quando é realizado de forma cíclica, com períodos de isolamento e agrupamento, alterações são observadas nos testes tradicionais para comportamento tipo ansioso (CARUSO et al., 2018; RIVERA et al., 2020). Por exemplo, Bloch e colaboradores (2020) não encontraram alterações nos comportamentos tipo ansiosos em testes realizados em camundongos C57BL/6j machos, adultos durante a abstinência prolongada ao etanol. Entretanto, quando o isolamento social pré-púbere é associado a outros fatores estressantes, como a intoxicação ao etanol, observa-se que os sintomas relacionados à ansiedade podem ser mais evidentes (SKELLY et al., 2015a). Adicionalmente, Skelly e colaboradores (2015) observaram que o isolamento social e o consumo de etanol em animais adolescentes levaram ao aumento nos comportamentos semelhantes à ansiedade, medo e a perturbações relacionadas ao estresse.

Em nosso estudo o exercício físico forçado promoveu surgimento dos comportamentos tipo ansiosos. Esses dados estão de acordo com a literatura, na qual encontram-se trabalhos que associam o fato de o exercício físico na esteira ser realizado de forma forçada ao estresse e, desta forma, esse poderia promover sensações semelhantes à ansiedade (LEASURE; JONES, 2008; SVENSSON et al., 2016). Por exemplo, Svensson e colaboradores (2016) mostraram que camundongos submetidos ao exercício físico forçado em esteira apresentaram maior tempo de permanência nos braços fechados do aparato usado no teste de LCE, quando comparados aos animais do grupo controle. No mesmo sentido, Leasure (2008) também observou aumento no comportamento tipo ansioso nos animais que foram submetidos ao exercício físico forçado quando comparado aos animais sedentários.

De forma contrária aos nossos resultados, Yan e colaboradores (2023) mostraram que o exercício físico normalizou o comportamento tipo ansioso nos camundongos adolescentes machos C57BL/6j que passaram pelo protocolo de estresse crônico. Da mesma forma, Seo e colaboradores (2018) mostraram que o exercício físico promoveu efeito ansiolítico em camundongos que foram submetidos previamente a fatores estressantes. Essas diferenças em relação ao presente estudo podem ser justificadas pelas diferenças nas idades dos animais, pelas

espécies utilizadas e pela duração do protocolo de exercício físico (SEO, 2018; LI et al., 2019; BLOCH et al., 2020; SEO, 2018; YAN et al., 2023).

Identificamos no teste de splash de sacarose 10% (m/v) que o isolamento social crônico, mas não o consumo de etanol, promoveu aumento no tempo de latência para iniciar o *grooming* e diminuiu o tempo de lambidas no dorso desses animais. Esses sintomas corroboraram a literatura (DU PREEZ et al., 2021; ISINGRINI et al., 2010).

Por exemplo, Preez e colaboradores (2021) mostraram que a pelagem dos animais submetidos ao estresse crônico de 6 semanas permaneceu mais tempo despenteada do que nos animais controle. Da mesma forma, Isingrini e colaboradores (2010) também verificaram diminuição no tempo de grooming em animais submetidos ao estresse crônico, quando comparado ao grupo controle (ISINGRINI et al., 2010; DU PREEZ et al., 2021).

Em relação ao consumo de etanol, Rivera-Irizarry e colaboradores (2023) mostraram que camundongos machos C57BL/6j que consumiram etanol no modelo voluntário de livre escolha não apresentaram alterações comportamentais no teste de nado forçado durante a abstinência protraída. De forma contrária, Dao e colaboradores (2020) mostraram que após 6 semanas de consumo de duas garrafas e abstinência forçada prolongada, camundongos C57BL/6J machos e fêmeas exibiram um perfil comportamental depressivo elevado (DAO et al., 2020; RIVERA-IRIZARRY et al., 2023).

Os estudos realizados em camundongos machos submetidos à administração crônica de etanol mostraram dados discrepantes em relação a avaliação nos comportamentos: aumento de conflito, anedonia e comportamentos compulsivos. Assim como discutido anteriormente no teste de ansiedade, esses dados em conjunto ressaltam a importância de se avaliar os modelos de consumo crônico de etanol adotados, assim como do período de abstinência escolhido para fazer a análise e qual comportamento específico tipo depressivo será avaliado (BLOCH et al., 2022b).

Quanto ao teste de nado forçado identificamos que os animais que permaneceram agrupados aumentaram o tempo de imobilidade quando comparados aos animais isolados, enquanto os animais do grupo exercício físico, independentemente dos outros fatores, apresentaram redução no tempo de imobilidade quando comparados aos animais sedentários.

Os dados referentes aos fatores isolamento social e consumo de etanol foram contrários aos dados da literatura, os quais demonstram que o humor negativo pode ser observado tanto no isolamento crônico quanto na abstinência protraída (HEILIG et al., 2010; SINHA; LI, 2007). Por exemplo, Medendorp e colaboradores (2018) realizaram o isolamento de forma crônica

durante a adolescência (PND21) e, após 3 meses de isolamento, encontraram aumento no tempo de imobilidade desses animais. Da mesma forma, Li e colaboradores (2019) demonstraram que os ratos machos Sprague-Dawley que consumiram etanol aumentaram o tempo de imobilidade tanto na abstinência aguda quanto na abstinência protraída quando comparados ao grupo controle (MEDENDORP et al., 2018; LI et al., 2019).

Apesar desses resultados serem contraditórios, as diferenças observadas quanto ao aumento na imobilidade dos animais do grupo agrupado podem ser explicadas por características inerentes à espécie escolhida neste experimento, quando comparada às outras espécies normalmente utilizadas para realização do teste do nado forçado. Por exemplo, Vöikar e colaboradores (2005) verificaram que o isolamento social crônico afetou de forma diferente o tempo de imobilidade em diferentes espécies de camundongos: os camundongos C57BL/6J apresentaram maior tempo de imobilidade, quando comparados aos camundongos DBA/2(VÖIKAR et al., 2005).

Os resultados encontrados em nosso estudo estão de acordo com a nossa hipótese: o exercício físico pode ter impacto positivo sobre alguns sintomas tipo depressivos. Luo e colaboradores (2020) mostraram que o exercício físico reverteu o comportamento tipo depressivo, diminuindo o tempo de imobilidade dos animais, quando comparados ao grupo que passou pelo protocolo de estresse crônico. Quando projetados para humanos, Nabkasorn e colaboradores (2006) mostraram que adolescentes com sintomas depressivos, quando treinados, obtiveram um melhor score no questionário aplicado para avaliação dos sintomas depressivos, quando comparados aos adolescentes que permaneceram sedentários. Da mesma forma, Xie e colaboradores (2022) mostraram que o exercício físico reverteu os sintomas tipo depressivos no camundongos expostos ao estresse crônico, quando comparados aos animais que permaneceram sedentários (NABKASORN et al., 2006; LUO et al., 2020; XIE et al., 2022).

No que diz respeito à memória, de forma contrária à nossa hipótese, as medidas de exploração do objeto novo mostraram que não houve alteração na capacidade de discriminação entre o objeto familiar e o objeto novo nos diferentes grupos experimentais. Entretanto, foi observado que o isolamento social diminuiu o tempo de exploração total dos objetos, quando comparados com os animais agrupados, durante o teste de 24 horas. Esses resultados corroboram, em parte, as evidências de que o estresse crônico pode afetar negativamente a plasticidade neuronal e produzir déficits na memória e nos processos de aprendizagem, assim como na motivação por explorar novidades (KIM; LEEM, 2016).

Esses achados estão condizentes com os estudos da literatura, os quais mostraram que o isolamento social quando é reproduzido de forma crônica, não promove alterações na aquisição e formação de memória. Por exemplo, Rivera-Irizarry e colaboradores (2020) demonstraram que camundongos adolescentes C57BL/6j machos (PND28), quando submetidos ao isolamento social crônico por 6 semanas durante a adolescência, não apresentaram alteração no teste de reconhecimento de objeto.

Alguns resultados da literatura em relação ao reconhecimento de objeto são conflituosos. Por exemplo, Lander e colaboradores (2017) reportaram que quando isolados na fase da adolescência tardia, os animais que passaram pelo isolamento social apresentaram aumento no índice de discriminação de objeto quando comparados aos animais do grupo controle. De forma contrária, Koike e colaboradores (2009) mostraram que os animais isolados durante a fase inicial da adolescência (PND21) apresentaram uma diminuição na preferência pela exploração do objeto novo quando comparados aos grupos controle (KOIKE et al., 2009; LANDER; LINDER-SHACHAM; GAISLER-SALOMON, 2017).

O processo de formação da memória pode ser influenciado pelos estados emocionais negativos e o hipocampo funciona como um mediador entre o processo de interpretação dos estados emocionais e a formação da memória propriamente dita (CHAVES, 1993).

Nesse sentido, inferimos que o estresse decorrente do isolamento social prejudicou a exploração do ambiente pelo possível surgimento do comportamento tipo apático nesses animais, identificados no teste de *splash* já descrito anteriormente (CHAVES, 1993). Quando extrapolados para estudos em humanos, esses resultados são condizentes com dados clínicos descritos na literatura. Como apresentado por Daumas e colaboradores (2023) e Yamagata e colaboradores (2004), foi observado através de exames de neuroimagens que os mecanismos de tomada de decisão baseada em recompensa estavam reduzidos nos pacientes apáticos. Esses dados corroboram a nossa hipótese de que o estresse decorrente do isolamento social prejudicou a exploração do ambiente pelo surgimento de um possível comportamento tipo apático nesses animais (CHAVES, 1993; DAUMAS et al., 2023; YAMAGATA; YAMAGUCHI; KOBAYASHI, 2004)).

No mesmo sentido de nossa hipótese, o teste do RotaRod mostrou que o exercício físico diminuiu o número de quedas na velocidade de 37rpm nos animais treinados quando comparados aos animais sedentários. Também observamos aumento no número de quedas nos animais agrupados quando comparados aos isolados. Como descrito na literatura, o exercício

físico promoveu uma melhora na coordenação motora dos animais treinados, quando comparados aos sedentários (MARLATT et al., 2012).

A terceira etapa desse experimento, teve por objetivo identificar as alterações promovidas pelo exercício físico forçado na abstinência protraída, na expressão das proteínas LC3 (I e II), p62, m-TORC1 e BDNF de camundongos *Swiss* submetidos à intoxicação ao etanol. Assim, nossa hipótese supôs que o estresse do isolamento social associado à intoxicação crônica ao etanol, durante a primeira fase da adolescência, promoveria supressão da fosforilação da proteína m-TORC1, o que desencadearia no aumento da expressão das proteínas associadas a formação do autofagolisossomo, LC3-II e p62, assim como promoveria a diminuição da proteína associada a plasticidade, BDNF. De forma contrária, o exercício físico promoveria a normalização na expressão das proteínas autofágicas e aumentaria a expressão de p-mTORC1 e de BDNF.

Observamos que nenhum tratamento promoveu alterações na expressão das proteínas LC3-I e p62. Não foi observado alteração na razão p-mTORC1 e t-mTORC1. Em relação à expressão das proteínas mTORC1 total e fosforilada, observou-se que o etanol promoveu diminuição nas suas expressões e que o exercício físico não reverteu essa alteração. Quanto à proteína BDNF, observou-se que o estresse do isolamento social promoveu diminuição em sua expressão enquanto o exercício físico não reverteu essa alteração.

De acordo com a literatura, tanto a expressão de BDNF quanto a manutenção da via da autofagia, através da regulação da expressão de proteínas a ela associada, são fundamentais para a manutenção das funções dos neurônios, das células da glia (PLA; PASCUAL; GUERRI, 2016a; PLAZA-ZABALA; SIERRA, 2024), do remodelamento sináptico e da plasticidade associada à formação da memória de longo prazo (LTP; sigla do inglês: *long term potentiation*) (NIKOLETOPOULOU; PAPANDREOU; TAVERNARAKIS, 2015).

A ativação constitutiva da autofagia, que promove a eliminação de proteínas danificadas é essencial para a sobrevivência neuronal (XILOURI; STEFANIS, 2010). Por exemplo, Nakamura e colaboradores (2006) mostraram que a autofagia basal no cérebro foi importante na prevenção de acúmulos de proteínas anormais (NAKAMURA et al., 2006).

De forma contrária aos nossos resultados, dados da literatura mostraram que tanto o estresse do isolamento social quanto o uso abusivo de etanol podem perturbar o fluxo autofágico (TANG et al., 2021). Por exemplo, Menk e colaboradores (2018) mostraram que o uso crônico

de etanol aumentou o processo de conversão da proteína LC3 e reduziu os níveis de expressão da proteína p62 (MENK et al., 2018).

A ativação e o processamento da autofagia aumentam a taxa de conversão entre as proteínas LC3-II/LC3-I e diminuem a expressão proteica de p62. Esse aumento é fundamental para maturação do autofagossomo e forte indicativo do processo autofágico (MIZUSHIMA; YOSHIMORI, 2007). Como em nosso estudo não foi possível quantificar os níveis de expressão das proteínas LC3-II e, ao quantificarmos as proteínas LC3-I e p62 não observamos diferença em relação ao grupo controle, inferimos que no momento da coleta do material biológico o fluxo autofágico não estava ativado. Apesar de ainda não terem sido bem elucidados, algumas possíveis explicações para as diferenças encontradas entre a literatura e o nosso estudo podem ser baseadas nos diferentes efeitos do uso agudo e crônico de etanol, assim como no tempo transcorrido entre o último consumo de etanol e as análises moleculares (KIM; GUAN, 2015; MENK et al., 2018b; XILOURI; STEFANIS, 2010).

O complexo m-TORC1 atua como principal mediador entre ativação e supressão da autofagia e transcrição de fatores neurotróficos (KIM; GUAN, 2015). Os mecanismos subjacentes a ativação ou inibição desse complexo pelo uso crônico do etanol ainda não são bem compreendidos e os dados encontrados na literatura são conflituosos.

Verificamos em nossos resultados que o uso crônico de etanol diminuiu a expressão das proteínas p-mTORC1 e t-mTORC1. De forma contrária, outros estudos mostraram que no SNC a exposição crônica ao etanol regulou de forma positiva a fosforilação do m-TORC1. Por exemplo, Pascual e colaboradores (2014) mostraram que o consumo de etanol aumentou a fosforilação de mTORC (PLA et al., 2014).

No contexto acima, a diminuição da mTORC1 pode estar relacionada a ativação da autofagia como possível mecanismo protetor frente a neurotoxicidade provocada pelo uso crônico de etanol (PLA; PASCUAL; GUERRI, 2016). Apesar de inicialmente ser considerado como mecanismo protetor, sabe-se que os efeitos do etanol na autofagia são dependentes da dose, quantidade consumida e região analisada. Em nosso trabalho, utilizamos concentrações de etanol que condizem à intoxicação moderada, enquanto que no estudo realizado por Pascual e colaboradores (2014) o consumo de etanol foi realizado no modelo de livre escolha e, como tal, as doses ingeridas não foram consideradas intoxicantes (PLA; PASCUAL; GUERRI, 2016b). No estudo de Luo e colaboradores (2014) foi utilizado modelo de células em cultura e, apesar de terem utilizado altas doses de etanol, os modelos *in vitro* apresentam limitações

mecanísticas pois não existe co-ativação de diferentes sistemas nem sobreposição de vias (LUO, 2014).

Analisando nossos resultados em conjunto, verificamos que apesar da m-TORC1 ter sido encontrada diminuída, nos animais do grupo etanol, não foram verificadas alterações nas proteínas do fluxo autofágico.

Verificamos em nosso trabalho que o estresse do isolamento social promoveu diminuição na expressão de BDNF. A literatura corrobora esses resultados e mostra que a expressão do BDNF é regulada por estímulos internos e externos e que o estresse decorrente do isolamento social, durante a primeira infância, pode alterar as expressões dessa proteína. Por exemplo, Li e colaboradores (2016), relataram que o isolamento social na primeira adolescência (PND 21-34) diminuíram a expressão da proteína BDNF na região do hipocampo. Da mesma forma, Murínová e colaboradores (2017) relataram que o estresse crônico também reduziu a expressão de BDNF.

Desregulações na expressão de BDNF tem sido associado a diversos distúrbios neuropsiquiátricos (AUTRY; MONTEGGIA, 2012) e o déficit na expressão dessa proteína no hipocampo tem sido relacionado a quadros depressivos (BUCKLEY et al., 2007). Por exemplo, Yao e colaboradores (2021) mostraram que o aumento na expressão de BDNF promoveu efeito tipo antidepressivo em roedores (YAO et al., 2021).

Estudos mostram que a expressão de BDNF pode ser regulada pela mTORC (AN et al., 2021b; TAKEI et al., 2014b), assim em nosso estudo a diminuição de BDNF pode ter sido resultado da diminuição de mTORC e p-mTORC.

Esses resultados da expressão da proteína BDNF, em conjunto com resultados anteriores, os quais mostraram que os animais do grupo isolamento social apresentaram redução no comportamento de autocuidado assim como diminuição na exploração pela novidade, suportaram a hipótese de que o estresse decorrente do isolamento social, quando realizado na primeira fase da adolescência, pode promover perturbações neurobiológicas e comportamentais duradouras.

6.2 PRINCIPAIS EVIDÊNCIAS

Em relação aos pontos observados em nossos resultados:

- Ciclos de intoxicação crônica ao etanol ou administração intraperitoneal dessa droga durante a adolescência, promovem alterações comportamentais duradouras;
- O aumento da expressão dos genes do CRF e CRF-BP decorrentes da intoxicação crônica ao etanol durante a adolescência foram intensificadas pelo exercício físico forçado;
- O modelo cíclico de intoxicação ao vapor de etanol, intercalado com períodos de abstinência durante a primeira fase da adolescência, promoveu aumento no consumo livre de etanol desses animais;
- Nem o modelo cíclico de intoxicação ao vapor de etanol nem o protocolo de exercício físico forçado promoveram alterações nos números de células da glia;
- O exercício físico forçado após o isolamento social e consumo de etanol durante a adolescência, promoveu o surgimento do comportamento tipo ansioso nos testes de LCE e CA;
- O isolamento social e o etanol, durante a adolescência, foram os fatores que mais influenciaram negativamente o transtorno de humor tipo depressivo, evidenciando o surgimento da apatia nos testes de exploração por objeto e *splash* de sacarose;
- O exercício físico forçado promoveu melhora cognitiva e no estado apático de animais no teste de *RotaRod* e nado forçado;
- O isolamento social e o etanol, durante a adolescência diminuíram as expressões das proteínas p e t-m-TORC1 e BDNF;

7. CONCLUSÃO

Diante de todo o apresentado e com base nos resultados obtidos, conclui-se que o consumo excessivo e a intoxicação crônica de ETOH durante a adolescência são preditores fortes para o aparecimento tardio de transtornos relacionados ao uso dessa substância, transtornos psiquiátricos, assim como para o surgimento de prejuízos cognitivos.

Conclui-se também que, embora a prática de exercício físico forçado não tenha normalizado a expressão dos genes CRF, CRF-BP, do comportamento tipo ansioso e das proteínas m-TORC e BDNF alteradas pelo isolamento social e/ou intoxicação por etanol, evidenciou-se que esta prática diminuiu o tempo de imobilidade no nado forçado, melhorou a

coordenação motora dos camundongos, podendo ser utilizado com ressalvas como coadjuvante ao tratamento dos sintomas associados à abstinência de etanol.

8. REFERÊNCIAS

ABRAHAO, K. P.; SALINAS, A. G.; LOVINGER, D. M. **Alcohol and the Brain: Neuronal Molecular Targets, Synapses, and Circuits**. *Neuron*, 2017.

ADERMARK, L.; BOWERS, M. S. Disentangling the role of astrocytes in alcohol use disorder. **Alcoholism, clinical and experimental research**, v. 40, n. 9, p. 1802, 1 set. 2016.

AGUIAR, A. S.; PINHO, R. A. Efeitos do exercício físico sobre o estado redox cerebral. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 13, n. 5, p. 355–360, 2007.

AHMED, S. P.; BITTENCOURT-HEWITT, A.; SEBASTIAN, C. L. Neurocognitive bases of emotion regulation development in adolescence. **Developmental Cognitive Neuroscience**, v. 15, p. 11, 3 out. 2015.

AID, T. et al. Mouse and rat BDNF gene structure and expression revisited. **Journal of Neuroscience Research**, v. 85, n. 3, p. 525–535, 15 fev. 2007.

ALAUX-CANTIN, S. et al. Alcohol intoxications during adolescence increase motivation for alcohol in adult rats and induce neuroadaptations in the nucleus accumbens. **Neuropharmacology**, v. 67, p. 521–531, 1 abr. 2013.

ALLEN, C. D. et al. Exposure to alcohol during adolescence exerts long-term effects on stress response and the adult brain stress circuits. **Neuroscience**, v. 339, p. 64–71, 17 dez. 2016.

ALLEN, C. D.; RIVIER, C. L.; LEE, S. Y. Adolescent alcohol exposure alters the central brain circuits known to regulate the stress response. **Neuroscience**, v. 182, p. 162–168, 19 maio 2011.

AN, X. et al. Role of BDNF-mTORC1 Signaling Pathway in Female Depression. **Neural Plasticity**, v. 2021, 2021a.

AN, X. et al. Role of BDNF-mTORC1 Signaling Pathway in Female Depression. **Neural Plasticity**, v. 2021, 2021b.

ANAND, S. K. et al. **Detrimental Effects of Alcohol-Induced Inflammation on Brain Health: From Neurogenesis to Neurodegeneration. Cellular and Molecular Neurobiology**Cell Mol Neurobiol, , 1 jul. 2023.

ANDERO, R.; CHOI, D. C.; RESSLER, K. J. BDNF-TrkB receptor regulation of distributed adult neural plasticity, Memory formation, and psychiatric disorders. Em: **Progress in Molecular Biology and Translational Science**. [s.l.] Prog Mol Biol Transl Sci, 2014. v. 122p. 169–192.

ANDERSEN, S. L., TEICHER, M. H. Delayed effects of early stress on hippocampal development. **Neuropsychopharmacology**, v. 29, p. 1988–1993, 2004.

ANDERSON, B.; RAY, O. S. Alcohol Problems and Alcoholism: A Comprehensive Survey. **PsycCRITIQUES**, v. 27, n. 2, p. 383, 1982.

ANDERSON, E.; DURSTINE, J. L. Physical activity, exercise, and chronic diseases: A brief review. **Sports Medicine and Health Science**, v. 1, n. 1, p. 3, 1 dez. 2019.

ANDERSON, G. S. et al. **The Impact of Acute Stress Physiology on Skilled Motor Performance: Implications for Policing. Frontiers in Psychology**Frontiers Media S.A., , 7 nov. 2019.

APPELBAUM, L. G. et al. **Synaptic plasticity and mental health: methods, challenges and opportunities. Neuropsychopharmacology**Nature Publishing Group, , 9 jul. 2023.

ATTILIA, F. et al. **Pharmacological treatment of alcohol use disorder. Scientific evidence. Rivista di Psichiatria**Riv Psichiatr, , 1 maio 2018.

AUTRY, A. E.; MONTEGGIA, L. M. **Brain-derived neurotrophic factor and neuropsychiatric disorders. Pharmacological Reviews**Pharmacol Rev, , abr. 2012.

BACKSTRÖM, T.; WINBERG, S. **Central corticotropin releasing factor and social stress. Frontiers in Neuroscience**Frontiers Research Foundation, , 9 jul. 2013.

BAHJI, A.; CROCKFORD, D.; EL-GUEBALY, N. Neurobiology and Symptomatology of Post-Acute Alcohol Withdrawal: A Mixed-Studies Systematic Review. **Journal of Studies on Alcohol and Drugs**, v. 83, n. 4, p. 461, 1 jul. 2022.

BAILEY, C. P. et al. Alterations in mesolimbic dopamine function during the abstinence period following chronic ethanol consumption. **Neuropharmacology**, v. 41, n. 8, p. 989–999, 2001.

BALDWIN, H. A. et al. CRF antagonist reverses the “anxiogenic” response to ethanol withdrawal in the rat. **Psychopharmacology**, v. 103, n. 2, p. 227–232, fev. 1991.

BARRY, G. et al. Specific Glial Populations Regulate Hippocampal Morphogenesis. **The Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 47, p. 12328, 11 nov. 2008.

BARTELS, C. et al. Recovery of hippocampus-related functions in chronic alcoholics during monitored long-term abstinence. **Alcohol and alcoholism (Oxford, Oxfordshire)**, v. 42, n. 2, p. 92–102, mar. 2007.

BASTOS, F. I. P. M. et al. **III LEVANTAMENTO NACIONAL SOBRE O USO DE DROGAS PELA POPULAÇÃO BRASILEIRA (III LNUD)**. [s.l.] ICICT/FIOCRUZ, 2017.

BECKER, H. C. Alcohol Dependence, Withdrawal, and Relapse. Em: **Neurobiology of Alcohol Dependence**. [s.l.] National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism, 2014. v. 31p. 377–410.

BECKER, H. C. **Influence of stress associated with chronic alcohol exposure on drinking**. **Neuropharmacology**, 2017a.

BECKER, H. C. **Influence of stress associated with chronic alcohol exposure on drinking**. **Neuropharmacology**, 1 ago. 2017b.

BECKER, H. C.; LOPEZ, M. F. Increased ethanol drinking after repeated chronic ethanol exposure and withdrawal experience in C57BL/6 mice. **Alcoholism, clinical and experimental research**, v. 28, n. 12, p. 1829–1838, dez. 2004.

BECKER, H. C.; MULHOLLAND, P. J. Neurochemical mechanisms of alcohol withdrawal. Em: **Handbook of Clinical Neurology**. [s.l.] NIH Public Access, 2014. v. 125p. 133–156.

BECKER, M.; PINHASOV, A.; ORNOY, A. Animal Models of Depression: What Can They Teach Us about the Human Disease? **Diagnostics**, v. 11, n. 1, 1 jan. 2021.

BEHAN, D. P. et al. Corticotropin releasing factor binding protein (CRF-BP) is expressed in neuronal and astrocytic cells. **Brain Research**, v. 698, n. 1–2, p. 259–264, 6 nov. 1995.

BEJARANO, E.; CUERVO, A. M. Chaperone-Mediated Autophagy. **Proceedings of the American Thoracic Society**, v. 7, n. 1, p. 29, 2 fev. 2010.

BENINGER, R. J.; MILLER, R. Dopamine D1-like receptors and reward-related incentive learning. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 22, n. 2, p. 335–345, 1998.

BIANCHI, P. C. et al. Chronic ethanol vapor exposure potentiates cardiovascular responses to acute stress in male but not in female rats. **Biology of Sex Differences**, v. 12, n. 1, 1 dez. 2021.

BINDER, D. K.; SCHARFMAN, H. E. **Brain-derived neurotrophic factor**. **Growth Factors** NIH Public Access, , set. 2004.

BLOCH, S. et al. Assessing negative affect in mice during abstinence from alcohol drinking: Limitations and future challenges. **Alcohol (Fayetteville, N.Y.)**, v. 100, p. 41, 1 maio 2022a.

BLOCH, S. et al. Assessing negative affect in mice during abstinence from alcohol drinking: Limitations and future challenges. **Alcohol (Fayetteville, N.Y.)**, v. 100, p. 41–56, 1 maio 2022b.

BLOOM, F. E. et al. Corticotropin releasing factor (CRF): immunoreactive neurones and fibers in rat hypothalamus. **Regulatory Peptides**, v. 4, n. 1, p. 43–48, 1 jun. 1982.

BOCKAERT, J.; MARIN, P. mTOR in brain physiology and pathologies. **Physiological Reviews**, v. 95, n. 4, p. 1157–1187, 1 out. 2015.

BOSCHEN, K. E. et al. Effects of developmental alcohol exposure vs. intubation stress on BDNF and TrkB expression in the hippocampus and frontal cortex of neonatal rats. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 43, p. 16–24, 1 jun. 2015.

BRADBURY, S. M. Lexicon of alcohol and drug terms, 1st edition. **Occupational and Environmental Medicine**, v. 52, n. 6, p. 431–431, 1995.

BRAMNESS, J. G. et al. History of Delirium Tremens in AUD Patients in Treatment: Relationship to AUD Severity and Other Factors. **Substance Abuse and Rehabilitation**, v. 13, p. 65, set. 2022.

BROWN, S. A. et al. Neurocognitive functioning of adolescents: Effects of protracted alcohol use. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 24, n. 2, p. 164–171, 2000.

BUCKLEY, P. F. et al. **Neurotrophins and schizophrenia. Schizophrenia Research** Schizophr Res, , ago. 2007.

CACIOPPO, J. T. et al. Social isolation. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1231, n. 1, p. 17–22, 2011.

CAMERON, C. M.; WIGHTMAN, R. M.; CARELLI, R. M. Dynamics of rapid dopamine release in the nucleus accumbens during goal-directed behaviors for cocaine versus natural rewards. **Neuropharmacology**, v. 86, p. 319–328, 2014.

CAMPANA, A. et al. **Projeto Diretrizes**. , 2012. . Acesso em: 24 abr. 2023

CAN, A. et al. The Mouse Forced Swim Test. **Journal of Visualized Experiments : JoVE**, n. 59, p. 3638, 2012.

CARBIA, C. et al. A systematic review of neuropsychological studies involving young binge drinkers. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 90, p. 332–349, 1 jul. 2018.

CARNICELLA, S.; RON, D.; BARAK, S. **Intermittent ethanol access schedule in rats as a preclinical model of alcohol abuse.** *Alcohol*, 2014.

CARRARA-NASCIMENTO, P. F. et al. SIMILAR ETHANOL DRINKING IN ADOLESCENT AND ADULT C57BL/6J MICE AFTER CHRONIC ETHANOL EXPOSURE AND WITHDRAWAL. *Alcoholism, clinical and experimental research*, v. 37, n. 6, p. 961, jun. 2013.

CARRASCO, G. A.; VAN DE KAR, L. D. Neuroendocrine pharmacology of stress. *European Journal of Pharmacology*, v. 463, n. 1–3, p. 235–272, 28 fev. 2003.

CARROLL, K. M.; KILUK, B. D. Cognitive behavioral interventions for alcohol and drug use disorders: Through the stage model and back again. *Psychology of Addictive Behaviors*, v. 31, n. 8, p. 847–861, 1 dez. 2017.

CARUSO, M. J. et al. Adolescent social stress increases anxiety-like behavior and ethanol consumption in adult male and female C57BL/6J mice OPEN. *Scientific Reports* |, v. 8, p. 10040, 2018a.

CARUSO, M. J. et al. Adolescent social stress increases anxiety-like behavior and ethanol consumption in adult male and female C57BL/6J mice. *Scientific Reports* **2018 8:1**, v. 8, n. 1, p. 1–7, 3 jul. 2018b.

CASEY, B. J.; GETZ, S.; GALVAN, A. The adolescent brain. *Developmental review : DR*, v. 28, n. 1, p. 62–77, mar. 2008.

CASEY, B. J.; JONES, R. M.; HARE, T. A. The Adolescent Brain. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1124, p. 111, 2008.

CASTREN, E. et al. **Regulation of brain-derived neurotrophic factor mRNA levels in hippocampus by neuronal activity.** *Progress in Brain Research. Anais...Prog Brain Res*, 1998.

CASTRÉN, E.; ANTILA, H. **Neuronal plasticity and neurotrophic factors in drug responses.** *Molecular Psychiatry* Europe PMC Funders, 11 abr. 2017.

CHAVES, M. L. F. Memória humana: aspectos clínicos e modulação por estados afetivos. *Psicologia USP*, v. 4, n. 1–2, p. 139–169, 1993.

CHEN, A. et al. Neuroprotective effect of brain-derived neurotrophic factor mediated by autophagy through the PI3K/Akt/mTOR pathway. *Molecular Medicine Reports*, v. 8, n. 4, p. 1011–1016, 2013.

CHEN, R. et al. Comparative neuropeptidomic analysis of food intake via a multifaceted mass spectrometric approach. *ACS Chemical Neuroscience*, v. 1, n. 3, p. 204–214, 17 mar. 2010.

CHEN, R. et al. Quantitative neuropeptidomics study of the effects of temperature change in the crab cancer borealis. **Journal of Proteome Research**, v. 13, n. 12, p. 5767–5776, 5 dez. 2014.

CHIO, C. C. et al. Exercise attenuates neurological deficits by stimulating a critical HSP70/NF-KB/IL-6/synapsin I axis in traumatic brain injury rats. **Journal of Neuroinflammation**, v. 14, n. 1, p. 1–18, 2017.

CISA. **Juventude e álcool: cenário atual - CISA - Centro de Informações sobre Saúde e Álcool**. Disponível em: <<https://www.cisa.org.br/pesquisa/dados-oficiais/artigo/item/32-juventude-e-alcool-cenario-atual>>. Acesso em: 13 set. 2023.

COSTA-MATTIOLI, M. et al. **Translational Control of Long-Lasting Synaptic Plasticity and Memory**. *Neuron*, 15 jan. 2009.

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

COYLE CP, S. M. Aerobic exercise training and depressive symptomatology in adults with physical disability. **Arch Phys Med Rehabil**, v. 76, p. 647–52, 1995.

CRIADO, J. R. et al. Prolonged Chronic Ethanol Exposure Alters Neuropeptide Y and Corticotropin-Releasing Factor Levels in the Brain of Adult Wistar Rats. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 99, n. 1, p. 104, jul. 2011a.

CRIADO, J. R. et al. Prolonged Chronic Ethanol Exposure Alters Neuropeptide Y and Corticotropin-Releasing Factor Levels in the Brain of Adult Wistar Rats. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 99, n. 1, p. 104, jul. 2011b.

CRIADO, J. R. et al. Prolonged Chronic Ethanol Exposure Alters Neuropeptide Y and Corticotropin-Releasing Factor Levels in the Brain of Adult Wistar Rats. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 99, n. 1, p. 104, jul. 2011c.

CROSS, F. L.; LIVINGSTONE, E. A. **The Oxford Dictionary of the Christian Church**. [s.l.] Oxford University Press, 2005.

CUTULI, D.; SAMPEDRO-PIQUERO, P. BDNF and its Role in the Alcohol Abuse Initiated During Early Adolescence: Evidence from Preclinical and Clinical Studies. **Current Neuropharmacology**, v. 20, n. 11, p. 2202–2220, 24 jun. 2022.

DABROWSKA, J. et al. Central CRF neurons are not created equal: Phenotypic differences in CRF-containing neurons of the rat paraventricular hypothalamus and the bed nucleus of the stria terminalis. **Frontiers in Neuroscience**, v. 7, n. 7 AUG, 2013.

DAO, N. C. et al. Forced Abstinence From Alcohol Induces Sex-Specific Depression-Like Behavioral and Neural Adaptations in Somatostatin Neurons in Cortical and Amygdalar Regions. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 14, 27 maio 2020.

DE SOTO, C. B.; O'DONNELL, W. E.; DE SOTO, J. L. Long-term recovery in alcoholics. **Alcoholism, clinical and experimental research**, v. 13, n. 5, p. 693–697, 1989.

DEACON, R. M. J. Measuring motor coordination in mice. **Journal of visualized experiments : JoVE**, n. 75, p. 2609, 2013.

DELANEY, K. et al. **New techniques, applications and perspectives in neuropeptide research.** **Journal of Experimental Biology** Company of Biologists, , 2 fev. 2018.

DENNINGER, J. K.; SMITH, B. M.; KIRBY, E. D. Novel object recognition and object location behavioral testing in mice on a budget. **Journal of Visualized Experiments**, v. 2018, n. 141, 11 nov. 2018.

DEWIT, D. J. et al. Age at first alcohol use: a risk factor for the development of alcohol disorders. **The American journal of psychiatry**, v. 157, n. 5, p. 745–750, maio 2000.

DIAMOND, I.; MESSING, R. O. **Neurologic effects of alcoholism.** **Western Journal of Medicine**, 1994.

DIANA, M. The dopamine hypothesis of drug addiction and its potential therapeutic value. **Frontiers in Psychiatry**, v. 2, n. NOV, 2011.

DING WX, ET AL. Autophagy reduces acute ethanol-induced hepatotoxicity and steatosis in mice. **Gastroenterology**, v. 139, p. 1740–52, 2010.

DRIVER HS, T. S. Exercise and sleep. **Sleep Med Rev**, v. 4, p. 387–402, 2000.

DR.YATES, B. **Pitt Medical Neuroscience | Glutamate Receptors.** Disponível em: <<https://pittmedneuro.com/glutamate.html>>. Acesso em: 14 set. 2023.

DU PREEZ, A. et al. Chronic stress followed by social isolation promotes depressive-like behaviour, alters microglial and astrocyte biology and reduces hippocampal neurogenesis in male mice. **Brain, behavior, and immunity**, v. 91, p. 24–47, 1 jan. 2021.

ELTOKHI, A.; KURPIERS, B.; PITZER, C. Comprehensive characterization of motor and coordination functions in three adolescent wild-type mouse strains. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1–12, 22 mar. 2021.

ENNA, S. J. GABA receptors. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 2, n. C, p. 62–64, 13 fev. 1981.

ERB, S. et al. Effects of chronic cocaine exposure on corticotropin-releasing hormone binding protein in the central nucleus of the amygdala and bed nucleus of the stria terminalis. **Neuroscience**, v. 123, n. 4, p. 1003–1009, 1 jan. 2004.

ERICKSON, E. K. et al. Glial gene networks associated with alcohol dependence. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–13, 29 jul. 2019.

EROGLU, C.; BARRES, B. A. **Regulation of synaptic connectivity by glia.** **Nature** Nature Publishing Group, , 10 nov. 2010.

EVANS, O. et al. Alcohol Binge Drinking and Anxiety-Like Behavior in Socialized Versus Isolated C57BL/6J Mice. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 44, n. 1, p. 244–254, 1 jan. 2020.

F. GOMEZ-PINILLA, Y. ZHUANG, J. FENG, Z. YING, AND G. F. Exercise impacts brain-derived neurotrophic factor plasticity by engaging mechanisms of epigenetic regulation. **Eur J Neurosci.**, v. 33, n. 3, p. 383–390, 2012.

FERREIRA, S. A. et al. Contribution of glial cells to the neuroprotective effects triggered by repetitive magnetic stimulation. **Neural Regeneration Research**, v. 19, n. 1, p. 116–123, jan. 2024.

FERREIRA, S. E.; TUFIK, S.; MELLO, M. T. DE. Neuroadaptação: uma proposta alternativa de atividade física para usuários de drogas em recuperação. **Revista Brasileira de Ciência e Movimento**, v. 9, n. 1, p. 31–39, 2001.

FIDLER, T. L. et al. Dependence induced increases in intragastric alcohol consumption in mice. **Addiction biology**, v. 17, n. 1, p. 13–32, jan. 2012.

FRASER, L. M. et al. Measuring anxiety-and locomotion-related behaviours in mice: A new way of using old tests. **Psychopharmacology**, v. 211, n. 1, p. 99–112, jul. 2010.

FULLER, R. K. et al. Disulfiram Treatment of Alcoholism: A Veterans Administration Cooperative Study. **JAMA: The Journal of the American Medical Association**, v. 256, n. 11, p. 1449–1455, 19 set. 1986.

G. CHEN, Z. KE, M. X. ET AL. Autophagy is a protective response to ethanol neurotoxicity. **Autophagy**, v. 8, p. 1577– 1589, 2012.

GARCÍA-GUTIÉRREZ, M. S. et al. Role of Cannabinoid CB2 Receptor in Alcohol Use Disorders: From Animal to Human Studies. **International Journal of Molecular Sciences** **2022, Vol. 23, Page 5908**, v. 23, n. 11, p. 5908, 25 maio 2022.

GAWIN, F. H.; KLEBER, H. D. Abstinence Symptomatology and Psychiatric Diagnosis in Cocaine Abusers: Clinical Observations. **Archives of General Psychiatry**, v. 43, n. 2, p. 107–113, 1986.

GIANCOLA, P. R. Alcohol and Aggression: Theories and Mechanisms. Em: **Alcohol-Related Violence: Prevention and Treatment**. [s.l: s.n.]. p. 35–59.

GILPIN, N. W. et al. **Vapor inhalation of alcohol in rats. Current Protocols in Neuroscience** NIH Public Access, , 2008.

GILPIN, N. W. Corticotropin-releasing factor (CRF) and neuropeptide Y (NPY): Effects on inhibitory transmission in central amygdala, and anxiety- & alcohol-related behaviors. **Alcohol**, v. 46, n. 4, p. 329–337, 1 jun. 2012.

GLICK, D.; BARTH, S.; MACLEOD, K. F. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. **J Pathol.**, v. 221, n. 1, p. 3–12, 2010.

GONCA, S. et al. Effects of chronic ethanol treatment on glial fibrillary acidic protein expression in adult rat optic nerve: an immunocytochemical study. **Cell biology international**, v. 29, n. 2, p. 169–172, 2005.

GORMAN-SANDLER, E.; HOLLIS, F. The forced swim test: Giving up on behavioral despair (Commentary on Molendijk & de Kloet, 2021). **European Journal of Neuroscience**, v. 55, n. 9–10, p. 2832–2835, 1 maio 2022.

GRANT, S. et al. **Mindfulness-based Relapse Prevention for Substance Use Disorders: A Systematic Review and Meta-analysis. Journal of Addiction Medicine** J Addict Med, , 2017.

GRIFASI, I. R. et al. A comparison of hippocampal microglial responses in aged and young rodents following dependent and non-dependent binge drinking. Em: **International Review of Neurobiology**. [s.l.] Academic Press, 2019a. v. 148p. 305–343.

GRIFASI, I. R. et al. Characterization of the Hippocampal Neuroimmune Response to Binge-Like Ethanol Consumption in the Drinking in the Dark Model. **NeuroImmunoModulation**, v. 26, n. 1, p. 19–32, 1 fev. 2019b.

GRIFFIN, W. C.; LOPEZ, M. F.; BECKER, H. C. Intensity and duration of chronic ethanol exposure is critical for subsequent escalation of voluntary ethanol drinking in mice. **Alcoholism, clinical and experimental research**, v. 33, n. 11, p. 1893–1900, nov. 2009.

GROVER, S.; GHOSH, A. Delirium Tremens: Assessment and Management. **Journal of Clinical and Experimental Hepatology**, v. 8, n. 4, p. 460, 1 dez. 2018.

GUEDES, P. R. N. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA-IBGE UNIDADES RESPONSÁVEIS. 2019.

HAASS-KOFFLER, C. L. et al. Defining the role of corticotropin releasing factor binding protein in alcohol consumption. **Translational Psychiatry** 2016 **6:11**, v. 6, n. 11, p. e953–e953, 15 nov. 2016.

HANSON, D. J. Preventing alcohol abuse: alcohol, culture, and control. **Choice Reviews Online**, v. 33, n. 01, p. 33- 0610-33–0610, 1995.

HAROON, E.; MILLER, A. H.; SANACORA, G. Inflammation, Glutamate, and Glia: A Trio of Trouble in Mood Disorders. **Neuropsychopharmacology**, v. 42, n. 1, p. 193–215, 2017.

HARRISON, J. E. et al. **ICD-11: an international classification of diseases for the twenty-first century**. **BMC Medical Informatics and Decision Making** BioMed Central Ltd, , 1 nov. 2021.

HAWKINS, E. G. et al. A novel cholinergic action of alcohol and the development of tolerance to that effect in *Caenorhabditis elegans*. **Genetics**, v. 199, n. 1, p. 135–149, 1 jan. 2015.

HE, J.; CREWS, F. T. Increased MCP-1 and microglia in various regions of the human alcoholic brain. **Experimental neurology**, v. 210, n. 2, p. 349–358, abr. 2008.

HEILIG, M. et al. **Acute withdrawal, protracted abstinence and negative affect in alcoholism: Are they linked?** **Addiction Biology** Addict Biol, , abr. 2010a.

HEILIG, M. et al. Acute withdrawal, protracted abstinence and negative affect in alcoholism: are they linked? **Addiction biology**, v. 15, n. 2, p. 169–184, abr. 2010b.

HERRINGA, R. J.; ROSEBOOM, P. H.; KALIN, N. H. Decreased amygdala CRF-binding protein mRNA in post-mortem tissue from male but not female bipolar and schizophrenic subjects. **Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 31, n. 8, p. 1822–1831, 9 ago. 2006.

HOLSTEIN, S. E.; SPANOS, M.; HODGE, C. W. Adolescent C57BL/6J mice show elevated alcohol intake, but reduced taste aversion, as compared to adult mice: a potential behavioral mechanism for binge drinking. **Alcoholism, clinical and experimental research**, v. 35, n. 10, p. 1842, out. 2011.

HOLTMAAT, A.; CARONI, P. **Functional and structural underpinnings of neuronal assembly formation in learning**. **Nature Neuroscience** Nat Neurosci, , 1 dez. 2016.

ISINGRINI, E. et al. Association between Repeated Unpredictable Chronic Mild Stress (UCMS) Procedures with a High Fat Diet: A Model of Fluoxetine Resistance in Mice. **PLoS ONE**, v. 5, n. 4, 2010.

JAFFE, J. H. The concept of dependence: historical reflections. **Alcohol Health and Research World**, v. 17, n. 3, p. 188–190, 1993.

JEANBLANC, J. et al. Animal models of binge drinking, current challenges to improve face validity. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 106, p. 112–121, 1 nov. 2019.

J.L. ZEHR, B.J. TODD, K.M. SCHULZ, M.M. MCCARTHY, C. L. S. Dendritic pruning of the medial amygdala during pubertal development of the male Syrian hamster. **J Neurobiol**, v. 66, p. 578–590, 2006.

KALUEFF, A. V. et al. Neurobiology of rodent self-grooming and its value for translational neuroscience. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 17, n. 1, p. 45–59, 1 jan. 2016a.

KALUEFF, A. V. et al. **Neurobiology of rodent self-grooming and its value for translational neuroscience**. **Nature Reviews Neuroscience** NIH Public Access, , 1 jan. 2016b.

KANE, C. J. M. et al. Effects of ethanol on immune response in the brain: Region-specific changes in aged mice. **Journal of Neuroinflammation**, v. 10, n. 1, p. 1–4, 23 maio 2013.

KAWAI, N. **Glutamate receptors. No to shinkei. Brain and nerve** Sinauer Associates, , 1994.

KETCHESIN, K. D.; STINNETT, G. S.; SEASHOLTZ, A. F. Binge Drinking Decreases Corticotropin-Releasing Factor-Binding Protein Expression in the Medial Prefrontal Cortex of Mice. **Alcoholism, clinical and experimental research**, v. 40, n. 8, p. 1641–1650, 1 ago. 2016.

KETCHESIN, K. D.; STINNETT, G. S.; SEASHOLTZ, A. F. **Corticotropin-releasing hormone-binding protein and stress: from invertebrates to humans**. **Stress** NIH Public Access, , 3 set. 2017.

KEYES, K. M. et al. **Stigma and treatment for alcohol disorders in the united states**. **American Journal of Epidemiology** Am J Epidemiol, , 15 dez. 2010.

KHAMSING, D. et al. A role for BDNF- and NMDAR-induced lysosomal recruitment of mTORC1 in the regulation of neuronal mTORC1 activity. **Molecular Brain**, v. 14, n. 1, p. 112, 1 dez. 2021.

KIM, D. M.; LEEM, Y. H. Chronic stress-induced memory deficits are reversed by regular exercise via AMPK-mediated BDNF induction. **Neuroscience**, v. 324, p. 271–285, 2 jun. 2016.

KIM, Y. C.; GUAN, K. L. mTOR: a pharmacologic target for autophagy regulation. **The Journal of clinical investigation**, v. 125, n. 1, p. 25–32, 2 jan. 2015.

KIM, Y. J. et al. A comparison of the metabolic effects of treadmill and wheel running exercise in mouse model. **Laboratory Animal Research**, v. 36, n. 1, p. 1–8, 1 dez. 2020.

KIMBROUGH, A. et al. Intermittent Access to Ethanol Drinking Facilitates the Transition to Excessive Drinking After Chronic Intermittent Ethanol Vapor Exposure. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 41, n. 8, p. 1502–1509, 1 ago. 2017.

KLIONSKY, D. J. et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (4th edition)1. **Autophagy**, v. 17, n. 1, p. 1–382, 2021.

KOIKE, H. et al. Behavioral abnormality and pharmacologic response in social isolation-reared mice. **Behavioural brain research**, v. 202, n. 1, p. 114–121, 24 ago. 2009.

KOOB, G. F. et al. Opponent process theory of motivation: neurobiological evidence from studies of opiate dependence. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 13, n. 2–3, p. 135–140, 1989.

KOOB, G. F. Alcoholism: allostasis and beyond. **Alcoholism, clinical and experimental research**, v. 27, n. 2, p. 232–243, 1 fev. 2003.

KOOB, G. F. The Role of CRF and CRF-related Peptides in the Dark Side of Addiction. **Brain research**, v. 1314C, p. 3, 2 fev. 2010a.

KOOB, G. F. The Role of CRF and CRF-related Peptides in the Dark Side of Addiction. **Brain research**, v. 1314C, p. 3, 2 fev. 2010b.

KOOB, G. F.; LE MOAL, M. Drug addiction, dysregulation of reward, and allostasis. **Neuropsychopharmacology**, v. 24, n. 2, p. 97–129, 2001.

KOOB, G. F.; LE MOAL, M. Addiction and the brain antireward system. **Annual Review of Psychology**, v. 59, p. 29–53, 2008.

KOOB, G. F.; VENDRUSCOLO, L. Theoretical Frameworks and Mechanistic Aspects of Alcohol Addiction: Alcohol Addiction as a Reward Deficit/Stress Surfeit Disorder. p. 1–61, 2023.

KOOB, G. F.; VOLKOW, N. D. **Neurocircuitry of addiction. Neuropsychopharmacology** Neuropsychopharmacology, , 2010a.

KOOB, G. F.; VOLKOW, N. D. **Neurocircuitry of addiction. Neuropsychopharmacology** Neuropsychopharmacology, , 2010b.

KOOB, G. F.; VOLKOW, N. D. **Neurobiology of addiction: a neurocircuitry analysis. The Lancet Psychiatry**, 2016a.

KOOB, G. F.; VOLKOW, N. D. Neurobiology of addiction: a neurocircuitry analysis. **The lancet. Psychiatry**, v. 3, n. 8, p. 760–773, 1 ago. 2016b.

KORBO, L. Glial cell loss in the hippocampus of alcoholics. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 23, n. 1, p. 164–168, 1 jan. 1999.

KORMOS, V.; GASZNER, B. **Role of neuropeptides in anxiety, stress, and depression: From animals to humans. Neuropeptides**Neuropeptides, , dez. 2013.

KRAEUTER, A. K.; GUEST, P. C.; SARNYAI, Z. The Open Field Test for Measuring Locomotor Activity and Anxiety-Like Behavior. Em: **Methods in Molecular Biology**. [s.l.] Humana Press Inc., 2019. v. 1916p. 99–103.

KUNOS, G. **Interactions Between Alcohol and the Endocannabinoid System. Alcoholism: Clinical and Experimental Research**Alcohol Clin Exp Res, , 1 abr. 2020.

KUNTSCHE, E. et al. Binge drinking: Health impact, prevalence, correlates and interventions. <https://doi.org/10.1080/08870446.2017.1325889>, v. 32, n. 8, p. 976–1017, 3 ago. 2017.

LACAGNINA, M. J.; RIVERA, P. D.; BILBO, S. D. Glial and Neuroimmune Mechanisms as Critical Modulators of Drug Use and Abuse. **Neuropsychopharmacology** **2017 42:1**, v. 42, n. 1, p. 156–177, 11 jul. 2016.

LACAGNINA, M. J.; RIVERA, P. D.; BILBO, S. D. **Glial and Neuroimmune Mechanisms as Critical Modulators of Drug Use and Abuse. Neuropsychopharmacology**Nature Publishing Group, , 11 jul. 2017. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/npp2016121>>. Acesso em: 23 maio. 2023

LANDER, S. S.; LINDER-SHACHAM, D.; GAISLER-SALOMON, I. Differential effects of social isolation in adolescent and adult mice on behavior and cortical gene expression. **Behavioural brain research**, v. 316, p. 245–254, 1 jan. 2017.

LE MOAL, M. **Drug abuse: vulnerability and transition to addiction. Pharmacopsychiatry**Pharmacopsychiatry, , 2009.

LEAL, G. et al. **Regulation of hippocampal synaptic plasticity by BDNF. Brain Research**Brain Res, , 24 set. 2015.

LEASURE, J. L.; JONES, M. Forced and voluntary exercise differentially affect brain and behavior. **Neuroscience**, v. 156, n. 3, p. 456–465, 15 out. 2008.

LEE, S. et al. Prolonged Exposure to Intermittent Alcohol Vapors Blunts Hypothalamic Responsiveness to Immune and Non-Immune Signals. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 24, n. 1, p. 110–122, 1 jan. 2000.

LEE, S. et al. Effect of Repeated Exposure to Alcohol on the Response of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis of the Rat: I. Role of Changes in Hypothalamic Neuronal Activity. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 25, n. 1, p. 98–105, 1 jan. 2001.

LEES, B. et al. Effect of alcohol use on the adolescent brain and behavior. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 192, p. 172906, 1 maio 2020.

LEGER, M. et al. Object recognition test in mice. **Nature Protocols** **2013 8:12**, v. 8, n. 12, p. 2531–2537, 21 nov. 2013.

LEWIS, R. G. et al. The Brain's Reward System in Health and Disease. Em: **Advances in Experimental Medicine and Biology**. [s.l.] NIH Public Access, 2021. v. 1344p. 57–69.

LI, J. et al. Differences between male and female rats in alcohol drinking, negative affects and neuronal activity after acute and prolonged abstinence. **International Journal of Physiology, Pathophysiology and Pharmacology**, v. 11, n. 4, p. 163, 2019.

LI, L. et al. The Prognostic Role of mTOR and P-mTOR for Survival in Non-Small Cell Lung Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. **PLOS ONE**, v. 10, n. 2, p. e0116771, 13 fev. 2015.

LI, Y. et al. Autophagy in Alcohol-Induced Multiorgan Injury : Mechanisms and Potential Therapeutic Targets. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 20, 2014.

LI, Z. et al. Effect of ethanol on the regulation of corticotropin-releasing factor (CRF) gene expression. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 29, n. 3, p. 345–354, 1 jul. 2005.

LIMA GIACOBBO, B. et al. **Brain-Derived Neurotrophic Factor in Brain Disorders: Focus on Neuroinflammation**. **Molecular Neurobiology** Springer, , 1 maio 2019.

LIN CW, ET AL. Pharmacological promotion of autophagy alleviates steatosis and injury in alcoholic and non-alcoholic fatty liver conditions in mice. **J Hepatol**, v. 58, p. 993–9, 2013.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.

LOGRIP, M. L. et al. Corticostriatal BDNF and alcohol addiction. **Brain Research**, v. 1628, n. 00, p. 60–67, 12 dez. 2015.

LOMBARDO, K. A. et al. Effects of acute and repeated restraint stress on corticotropin-releasing hormone binding protein mRNA in rat amygdala and dorsal hippocampus. **Neuroscience Letters**, v. 302, n. 2–3, p. 81–84, 20 abr. 2001.

LOVINGER, D. M. Serotonin's role in alcohol's effects on the brain. **Alcohol Research and Health**, v. 21, n. 2, p. 114–120, 1997.

LOVINGER, D. M.; ROBERTO, M. Synaptic effects induced by alcohol. **Current Topics in Behavioral Neurosciences**, v. 13, p. 31–86, 24 jul. 2011.

LOVINGER, D. M.; ROBERTO, M. Synaptic Effects Induced by Alcohol. Em: **Current topics in behavioral neurosciences**. [s.l.] Curr Top Behav Neurosci, 2023.

LOWE, P. P. et al. Chronic alcohol-induced neuroinflammation involves CCR2/5-dependent peripheral macrophage infiltration and microglia alterations. **Journal of neuroinflammation**, v. 17, n. 1, 9 out. 2020.

LU, B.; NAGAPPAN, G.; LU, Y. BDNF and synaptic plasticity, cognitive function, and dysfunction. **Handbook of Experimental Pharmacology**, v. 220, p. 223–250, 2015.

LU, B.; PANG, P. T.; WOO, N. H. **The yin and yang of neurotrophin action**. **Nature Reviews Neuroscience** Nat Rev Neurosci, , 1 ago. 2005.

LUKES, J. L. et al. Adult rats exposed to early-life social isolation exhibit increased anxiety and conditioned fear behavior, and altered hormonal stress responses. **Hormones and Behavior**, v. 55, n. 1, p. 248–256, 1 jan. 2009.

LUNDGAARD, I. et al. Beneficial effects of low alcohol exposure, but adverse effects of high alcohol intake on glymphatic function. **Scientific Reports 2018 8:1**, v. 8, n. 1, p. 1–16, 2 fev. 2018.

LUO, J. **Autophagy and ethanol neurotoxicity**. **Autophagy** Autophagy, , 1 dez. 2014a.

LUO, J. Autophagy and ethanol neurotoxicity. **Autophagy**, v. 10, n. 12, p. 2099, 1 dez. 2014b.

MACHT, V. et al. Indomethacin restores loss of hippocampal neurogenesis and cholinergic innervation and reduces innate immune expression and reversal learning deficits in adult male and female rats following adolescent ethanol exposure. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 47, n. 3, p. 470–485, 1 mar. 2023.

MAINS, R. E.; EIPPER, B. A. Neuropeptide Functions and Regulation. **Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects. 6th edition.**, 1999.

MANDYAM, C. D. The Interplay between the Hippocampus and Amygdala in Regulating Aberrant Hippocampal Neurogenesis during Protracted Abstinence from Alcohol Dependence. **Frontiers in Psychiatry**, v. 4, n. JUN, 2013a.

MANDYAM, C. D. The Interplay between the Hippocampus and Amygdala in Regulating Aberrant Hippocampal Neurogenesis during Protracted Abstinence from Alcohol Dependence. **Frontiers in Psychiatry**, v. 4, n. JUN, 2013b.

MANTSCH, J. R. Corticotropin releasing factor and drug seeking in substance use disorders: Preclinical evidence and translational limitations. **Addiction neuroscience**, v. 4, p. 100038, dez. 2022a.

MANTSCH, J. R. Corticotropin releasing factor and drug seeking in substance use disorders: Preclinical evidence and translational limitations. **Addiction Neuroscience**, v. 4, p. 100038, dez. 2022b.

MARLATT, M. W. et al. Running throughout middle-age improves memory function, hippocampal neurogenesis and BDNF levels in female C57Bl/6J mice. **Developmental neurobiology**, v. 72, n. 6, p. 943, jun. 2012.

MARTINOTTI, G. et al. Alcohol protracted withdrawal syndrome: the role of anhedonia. **Substance use & misuse**, v. 43, n. 3–4, p. 271–284, fev. 2008.

MARTY, V. N. et al. Chronic alcohol disrupts hypothalamic responses to stress by modifying CRF and NMDA receptor function. **Neuropharmacology**, v. 167, 1 maio 2020a.

MARTY, V. N. et al. Chronic alcohol disrupts hypothalamic responses to stress by modifying CRF and NMDA receptor function. **Neuropharmacology**, v. 167, p. 107991, 5 maio 2020b.

MARTY, V. N. et al. Chronic alcohol disrupts hypothalamic responses to stress by modifying CRF and NMDA receptor function. **Neuropharmacology**, v. 167, p. 107991, 5 maio 2020c.

MARTY, V. N. et al. Chronic alcohol disrupts hypothalamic responses to stress by modifying CRF and NMDA receptor function. **Neuropharmacology**, v. 167, p. 107991, 5 maio 2020d.

MASHAL KHAN. **Manual MSD**. Disponível em: <<https://www.msdmanuals.com/pt-br/casa/distúrbios-de-saúde-mental/transtornos-por-uso-de-substâncias/transtornos-por-uso-de-substâncias>>. Acesso em: 25 abr. 2023.

MASON, B.; HEYSER, C. Acamprosate: A Prototypic Neuromodulator in the Treatment of Alcohol Dependence. **CNS & Neurological Disorders - Drug Targets**, v. 9, n. 1, p. 23–32, 15 jun. 2012.

MAYO-SMITH, M. F. **Pharmacological management of alcohol withdrawal: A meta-analysis and evidence-based practice guideline**. **JAMA**, , 9 jul. 1997.

MCCOOL, B. A.; CHAPPELL, A. M. Chronic intermittent ethanol inhalation increases ethanol self-administration in both C57BL/6J and DBA/2J mice. **Alcohol (Fayetteville, N.Y.)**, v. 49, n. 2, p. 111–120, 1 mar. 2015.

MCGOVERN, P. et al. Early Neolithic wine of Georgia in the South Caucasus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 114, n. 48, p. E10309–E10318, 28 nov. 2017.

MCGOVERN, P. E. et al. Fermented beverages of pre- and proto-historic China. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 51, p. 17593–17598, 21 dez. 2004.

MEE-INTA, O.; ZHAO, Z. W.; KUO, Y. M. Physical Exercise Inhibits Inflammation and Microglial Activation. **Cells** **2019**, Vol. 8, Page 691, v. 8, n. 7, p. 691, 9 jul. 2019.

MELBOURNE, J. K. et al. Primed for addiction: A critical review of the role of microglia in the neurodevelopmental consequences of adolescent alcohol drinking. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 45, n. 10, p. 1908–1926, 1 out. 2021a.

MELBOURNE, J. K. et al. Primed for addiction: A critical review of the role of microglia in the neurodevelopmental consequences of adolescent alcohol drinking. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 45, n. 10, p. 1908–1926, 1 out. 2021b.

MENK, M. et al. Chronic alcohol consumption inhibits autophagy and promotes apoptosis in the liver. **International Journal of Medical Sciences**, v. 15, n. 7, p. 682–688, 27 abr. 2018a.

MENK, M. et al. Chronic Alcohol Consumption Inhibits Autophagy and Promotes Apoptosis in the Liver. **International journal of medical sciences**, v. 15, n. 7, p. 682–688, 27 abr. 2018b.

M.H. TEICHER, S.L. ANDERSEN, J.C. HOSTETTER, J. Evidence for dopamine receptor pruning between adolescence and adulthood in striatum but not nucleus accumbens. **Brain Res Dev Brain Res**, v. 89, p. 167–172, 1995.

MINICHIELLO, L. **TrkB signalling pathways in LTP and learning**. **Nature Reviews Neuroscience** Nat Rev Neurosci, , dez. 2009.

MIZUSHIMA, N.; YOSHIMORI, T. How to interpret LC3 immunoblotting. **Autophagy**, v. 3, n. 6, p. 542–545, 2007.

MOFFAT, J. J.; RON, D. Astrocytes and alcohol: cortical astrocytes regulate alcohol consumption and intoxication. 2020.

MOGRABI, K. D. M. et al. Chronic unpredictable restraint stress increases hippocampal pro-inflammatory cytokines and decreases motivated behavior in rats. **Stress (Amsterdam, Netherlands)**, v. 23, n. 4, p. 427–436, 3 jul. 2020.

MONTEIRO, S. et al. An efficient chronic unpredictable stress protocol to induce stress-related responses in C57BL/6 mice. **Frontiers in psychiatry**, v. 6, n. FEB, 2015.

MONTESINOS, J. et al. Binge-like ethanol treatment in adolescence impairs autophagy and hinders synaptic maturation: Role of TLR4. **Neuroscience Letters**, v. 682, p. 85–91, 2018.

MOORE, E. M. et al. Adolescent C57BL/6J (but not DBA/2J) mice consume greater amounts of limited-access ethanol compared to adults and display continued elevated ethanol intake into adulthood. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 34, n. 4, p. 734–742, 1 abr. 2010.

MOST, D.; FERGUSON, L.; HARRIS, R. A. Molecular basis of alcoholism. Em: **Handbook of Clinical Neurology**. [s.l.] NIH Public Access, 2014. v. 125p. 89–111.

MOTA, N. et al. Binge drinking trajectory and neuropsychological functioning among university students: A longitudinal study. **Drug and Alcohol Dependence**, v. 133, n. 1, p. 108–114, 1 nov. 2013.

MUNIER, J. J. et al. Chronic intermittent ethanol exposure disrupts stress-related tripartite communication to impact affect-related behavioral selection in male rats. **Neurobiology of Stress**, v. 24, 1 maio 2023.

MYERS, J.; KOKKINOS, P.; NYELIN, E. Physical Activity, Cardiorespiratory Fitness, and the Metabolic Syndrome. **Nutrients**, v. 11, n. 7, 1 jul. 2019.

NACE, E. P. Treating Alcohol Dependence: A Coping Skills Training Guide. **Journal of Studies on Alcohol**, v. 52, n. 6, p. 616–617, 1991.

NAYAK, D.; ROTH, T. L.; MCGAVERN, D. B. **Microglia development and function. Annual Review of Immunology** Annu Rev Immunol, , 2014.

NELSON, J. C. et al. Repetitive binge-like consumption based on the Drinking-in-the-Dark model alters the microglial population in the mouse hippocampus. **Journal of Integrative Neuroscience**, v. 20, n. 4, p. 933–943, 1 dez. 2021.

NICOLAIDES, N. C.; CHROUSOS, G. P. Corticotropin-releasing hormone (CRH). Em: **Encyclopedia of Endocrine Diseases**. [s.l.: s.n.]. p. 1–9.

NIKOLETOPOULOU, V. et al. Modulation of Autophagy by BDNF Underlies Synaptic Plasticity. **Cell Metabolism**, v. 26, n. 1, p. 230–242.e5, 2017.

NIKOLETOPOULOU, V.; PAPANDREOU, M. E.; TAVERNARAKIS, N. Autophagy in the physiology and pathology of the central nervous system. **Cell Death and Differentiation**, v. 22, n. 3, p. 398–407, 2015.

NIXON, K. et al. Distinct cell proliferation events during abstinence after alcohol dependence: Microglia proliferation precedes neurogenesis. **Neurobiology of Disease**, v. 31, n. 2, p. 218–229, ago. 2008.

NUSBAUM, M. P.; BLITZ, D. M.; MARDER, E. **Functional consequences of neuropeptide and small-molecule co-transmission.** *Nature Reviews Neuroscience* NIH Public Access, , 1 jul. 2017.

OLAH, M. et al. Enhanced hippocampal neurogenesis in the absence of microglia T cell interaction and microglia activation in the murine running wheel model. *Glia*, v. 57, n. 10, p. 1046–1061, 1 ago. 2009.

OMS. **Álcool - OPAS/OMS | Organização Pan-Americana da Saúde.** Disponível em: <<https://www.paho.org/pt/topicos/alcool>>. Acesso em: 24 maio. 2023.

ONU. **Versão final da nova Classificação Internacional de Doenças.** Disponível em: <<https://www.paho.org/pt/noticias/11-2-2022-versao-final-da-nova-classificacao-internacional-doencas-da-oms-cid-11-e>>. Acesso em: 13 set. 2023.

OPAS/OMS. **OPAS/OMS Brasil - Organização Mundial da Saúde divulga novas estatísticas mundiais de saúde.** Disponível em: <<https://www.paho.org/pt/noticias/17-5-2018-organizacao-mundial-da-saude-divulga-novas-estatisticas-mundiais-saude>>. Acesso em: 14 set. 2023.

PARK, J. H.; LEE, G.; BLENIS, J. **Structural Insights into the Activation of mTORC1 on the Lysosomal Surface.** *Trends in Biochemical Sciences* NIH Public Access, , 1 maio 2020.

PAUTASSI, R. M. et al. Adolescent but not adult rats exhibit ethanol-mediated appetitive second-order conditioning. *Alcoholism, clinical and experimental research*, v. 32, n. 11, p. 2016–2027, nov. 2008a.

PAUTASSI, R. M. et al. Adolescent but not adult rats exhibit ethanol-mediated appetitive second-order conditioning. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, v. 32, n. 11, p. 2016–2027, 1 nov. 2008b.

PAXINOS, G.; FRANKLIN, K. B. J. Paxinos and Franklin's the Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates. *Academic Press*, v. 2nd Editio, p. 360, 2001.

PEREA, G.; SUR, M.; ARAQUE, A. **Neuron-glia networks: Integral gear of brain function.** *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 2014.

PEREGUD, D. I. et al. **Role of BDNF in Neuroplasticity Associated with Alcohol Dependence.** *Biochemistry (Moscow)* Biochemistry (Mosc), , 1 mar. 2023a.

PEREGUD, D. I. et al. Role of BDNF in Neuroplasticity Associated with Alcohol Dependence. *Biochemistry. Biokhimiia*, v. 88, n. 3, p. 404–416, 1 mar. 2023b.

PEREGUD, D.; STEPANICHEV, M.; GULYAEVA, N. Drinking Pattern in Intermittent Access Two-Bottle-Choice Paradigm in Male Wistar Rats Is Associated with Exon-Specific BDNF Expression in the Hippocampus During Early Abstinence. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 71, n. 2, p. 262–275, 1 fev. 2021.

PERKINS, D. I. et al. **Molecular targets and mechanisms for ethanol action in glycine receptors. Pharmacology and Therapeutics** NIH Public Access, , jul. 2010.

PLA, A. et al. TLR4 mediates the impairment of ubiquitin-proteasome and autophagy-lysosome pathways induced by ethanol treatment in brain. **Cell death & disease**, v. 5, n. 2, fev. 2014.

PLA, A.; PASCUAL, M.; GUERRI, C. Autophagy constitutes a protective mechanism against ethanol toxicity in mouse astrocytes and neurons. **PLoS ONE**, v. 11, n. 4, 1 abr. 2016a.

PLA, A.; PASCUAL, M.; GUERRI, C. Autophagy Constitutes a Protective Mechanism against Ethanol Toxicity in Mouse Astrocytes and Neurons. **PLoS ONE**, v. 11, n. 4, 1 abr. 2016b.

PLAZA-ZABALA, A.; SIERRA, A. Studying Autophagy in Microglia: Overcoming the Obstacles. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 2713, p. 45–70, 2024.

POHORECKY, L. A.; BRICK, J. Pharmacology of ethanol. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 36, n. 2–3, p. 335–427, 1 jan. 1988.

POOLE, D. C. et al. **Guidelines for animal exercise and training protocols for cardiovascular studies. American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology** American Physiological Society, , 1 maio 2020.

POTTER, E. et al. The central distribution of a corticotropin-releasing factor (CRF)-binding protein predicts multiple sites and modes of interaction with CRF. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 9, p. 4192–4196, 1992.

PRINZ, M. et al. **Microglia and Central Nervous System-Associated Macrophages — from Origin to Disease Modulation. Annual Review of Immunology** Annu Rev Immunol, , 26 abr. 2021.

PRZYBYCIEN-SZYMANSKA, M. M. et al. Binge-pattern alcohol exposure during puberty induces long-term changes in HPA axis reactivity. **PLoS ONE**, v. 6, n. 4, 2011.

PUCCI, M. et al. Environmental stressors and alcoholism development: Focus on molecular targets and their epigenetic regulation. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 106, p. 165–181, 1 nov. 2019a.

PUCCI, M. et al. Environmental stressors and alcoholism development: Focus on molecular targets and their epigenetic regulation. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 106, p. 165–181, 1 nov. 2019b.

PUCCI, M. et al. **Environmental stressors and alcoholism development: Focus on molecular targets and their epigenetic regulation. Neuroscience and Biobehavioral Reviews**Pergamon, , 1 nov. 2019c.

RANDALL-DEMLLO, S.; CHIEPPA, M.; ERI, R. **Intestinal epithelium and autophagy: Partners in gut homeostasis. Frontiers in Immunology**Front Immunol, , 2013.

RASIAH, N. P.; LOEWEN, S. P.; BAINS, J. S. **Windows into stress: a glimpse at emerging roles for CRHPVN neurons. Physiological reviews**NLM (Medline), , 1 abr. 2023.

RAUSCH, S. et al. mTOR and mTOR phosphorylation status in primary and metastatic renal cell carcinoma tissue: differential expression and clinical relevance. **Journal of cancer research and clinical oncology**, v. 145, n. 1, p. 153–163, 22 jan. 2019.

RAY, L. A. et al. **State-of-the-art behavioral and pharmacological treatments for alcohol use disorder. American Journal of Drug and Alcohol Abuse**NIH Public Access, , 4 mar. 2019.

RAY, L. A. et al. Combined Pharmacotherapy and Cognitive Behavioral Therapy for Adults With Alcohol or Substance Use Disorders: A Systematic Review and Meta-analysis. **JAMA Network Open**, v. 3, n. 6, 19 jun. 2020.

REYNOLDS, J. C.; LEE, C. Mouse Fitness as Determined Through Treadmill Running and Walking. Em: **Methods in Molecular Biology**. [s.l.] Humana Press Inc., 2020. v. 2144p. 57–65.

RICE, J. M. et al. Associations Between Expectations Regarding Exercise Response And Acute And Chronic Anxiety Responses To Resistance Exercise. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v. 55, n. 9S, p. 102–102, set. 2023.

RIGHI, T. et al. Consumo de álcool e a influência do exercício físico na atividade enzimática de ratos wistar. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 22, n. 1, p. 40–44, 2016.

RIVERA, D. S. et al. Effects of long-lasting social isolation and re-socialization on cognitive performance and brain activity: a longitudinal study in Octodon degus. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, 1 dez. 2020.

RIVERA-IRIZARRY, J. K.; SKELLY, M. J.; PLEIL, K. E. Social Isolation Stress in Adolescence, but not Adulthood, Produces Hypersocial Behavior in Adult Male and Female C57BL/6J Mice. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 14, p. 555111, 24 jul. 2020a.

RIVERA-IRIZARRY, J. K.; SKELLY, M. J.; PLEIL, K. E. Social Isolation Stress in Adolescence, but not Adulthood, Produces Hypersocial Behavior in Adult Male and Female C57BL/6J Mice. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 14, 24 jul. 2020b.

ROBBINS, T. W.; EVERITT, B. J. Neurobehavioural mechanisms of reward and motivation. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 6, n. 2, p. 228–236, 1996.

ROBERTO, M. et al. Corticotropin Releasing Factor-Induced Amygdala Gamma-Aminobutyric Acid Release Plays a Key Role in Alcohol Dependence. **Biological Psychiatry**, v. 67, n. 9, p. 831–839, 1 maio 2010.

ROGERS, P. D.; HARRIS, J.; JARMUSKEWICZ, J. Alcohol and adolescence. **Pediatric Clinics of North America**, v. 34, n. 2, p. 289–303, 1987.

ROMEO, R. D. **The Teenage Brain: The Stress Response and the Adolescent Brain**. **Current Directions in Psychological Science** Curr Dir Psychol Sci, , 2013.

ROOZEN, H. G. et al. A systematic review of the effectiveness of the community reinforcement approach in alcohol, cocaine and opioid addiction. **Drug and Alcohol Dependence**, 9 abr. 2004a.

ROOZEN, H. G. et al. A systematic review of the effectiveness of the community reinforcement approach in alcohol, cocaine and opioid addiction. **Drug and Alcohol Dependence** Drug Alcohol Depend, , 9 abr. 2004b.

ROTH, A. D.; NÚÑEZ, M. T. Oligodendrocytes: Functioning in a delicate balance between high metabolic requirements and oxidative damage. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 949, p. 167–181, 1 out. 2016.

ROTZINGER, S.; LOVEJOY, D. A.; TAN, L. A. **Behavioral effects of neuropeptides in rodent models of depression and anxiety**. **Peptides**, abr. 2010.

ROYCE, J. E.; SCRATCHLEV, D. **Alcoholism and Other Drug Problems** -. Disponível em:

<[https://www.google.com.br/books/edition/Alcoholism_and_Other_Drug_Problems/9IW-y4JXhdAC?hl=pt-](https://www.google.com.br/books/edition/Alcoholism_and_Other_Drug_Problems/9IW-y4JXhdAC?hl=pt-PT&gbpv=1&dq=inauthor:%22James+E.+Royce%22&printsec=frontcover)

[PT&gbpv=1&dq=inauthor:%22James+E.+Royce%22&printsec=frontcover](https://www.google.com.br/books/edition/Alcoholism_and_Other_Drug_Problems/9IW-y4JXhdAC?hl=pt-PT&gbpv=1&dq=inauthor:%22James+E.+Royce%22&printsec=frontcover)>. Acesso em: 14 set. 2023.

SAHMSA. **Key substance use and mental health indicators in the United States: Results from the 2021 national survey on drug use and health**HHS Publication No. PEP19-5068, NSDUH Series H-54. [s.l: s.n.].

SAITO, T.; SOYA, H. Delineation of responsive AVP-containing neurons to running stress in the hypothalamus. **American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 286, n. 3 55-3, p. 484–490, 2004.

SALGUERO, A. et al. Binge-Like, Naloxone-Sensitive, Voluntary Ethanol Intake at Adolescence Is Greater Than at Adulthood, but Does Not Exacerbate Subsequent Two-Bottle Choice Drinking. **Frontiers in behavioral neuroscience**, v. 14, 9 abr. 2020.

SARMIENTO, C.; LAU, C. Diagnostic and statistical manual of mental disorders, 5th ed.: DSM-5. Em: **The Wiley Encyclopedia of Personality and Individual Differences, Personality Processes and Individuals Differences**. [s.l: s.n.]. p. 125–129.

SCHREIBER, A. L.; GILPIN, N. W. Corticotropin-Releasing Factor (CRF) Neurocircuitry and Neuropharmacology in Alcohol Drinking. Em: **Handbook of Experimental Pharmacology**. [s.l.] NIH Public Access, 2018a. v. 248p. 435–471.

SCHREIBER, A. L.; GILPIN, N. W. Corticotropin-Releasing Factor (CRF) Neurocircuitry and Neuropharmacology in Alcohol Drinking. **Handbook of experimental pharmacology**, v. 248, p. 435, 2018b.

SCHUCKIT, M. A.; HESSELBROCK, V. Alcohol dependence and anxiety disorders: What is the relationship? **American Journal of Psychiatry**, v. 151, n. 12, p. 1723–1734, 1994.

SCHULER, M. S. et al. Perceived barriers to treatment for alcohol problems: A latent class analysis. **Psychiatric Services**, v. 66, n. 11, p. 1221–1228, 1 nov. 2015.

SEEMILLER, L. R.; GOULD, T. J. The effects of adolescent alcohol exposure on learning and related neurobiology in humans and rodents. **Neurobiology of learning and memory**, v. 172, p. 107234, 1 jul. 2020.

SEIBENHENER, M. L.; WOOTEN, M. C. Use of the open field maze to measure locomotor and anxiety-like behavior in mice. **Journal of Visualized Experiments**, n. 96, 6 fev. 2015.

SEO, J. H. Treadmill exercise alleviates stress-induced anxiety-like behaviors in rats. **Journal of Exercise Rehabilitation**, v. 14, n. 5, p. 724, 1 out. 2018.

SEQUEIRA-CORDERO, A. et al. Behavioural characterisation of chronic unpredictable stress based on ethologically relevant paradigms in rats. **Scientific Reports 2019 9:1**, v. 9, n. 1, p. 1–21, 22 nov. 2019.

SHIOTSUKI, H. et al. A rotarod test for evaluation of motor skill learning. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 189, n. 2, p. 180–185, jun. 2010.

SIDHU, H.; KREIFELDT, M.; CONTET, C. Affective Disturbances During Withdrawal from Chronic Intermittent Ethanol Inhalation in C57BL/6J and DBA/2J Male Mice. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 42, n. 7, p. 1281–1290, 1 jul. 2018.

SILVA-PENÑA, D. et al. Alcohol-induced cognitive deficits are associated with decreased circulating levels of the neurotrophin BDNF in humans and rats. **Addiction Biology**, v. 24, n. 5, p. 1019–1033, 2019.

SIMON, B. et al. The Effects of Alcohol Intoxication and Withdrawal on Hypothalamic Neurohormones and Extrahypothalamic Neurotransmitters. **Biomedicines**, v. 11, n. 5, 1 maio 2023a.

SIMON, B. et al. The Effects of Alcohol Intoxication and Withdrawal on Hypothalamic Neurohormones and Extrahypothalamic Neurotransmitters. **Biomedicines**, v. 11, n. 5, 1 maio 2023b.

SINHA, R.; LI, C. S. R. Imaging stress- and cue-induced drug and alcohol craving: association with relapse and clinical implications. **Drug and alcohol review**, v. 26, n. 1, p. 25–31, jan. 2007.

SKELLY, M. J. et al. Adolescent social isolation increases anxiety-like behavior and ethanol intake and impairs fear extinction in adulthood: possible role of disrupted noradrenergic signaling. **Neuropharmacology**, v. 97, p. 149, 25 jun. 2015a.

SKELLY, M. J. et al. Adolescent social isolation increases anxiety-like behavior and ethanol intake and impairs fear extinction in adulthood: Possible role of disrupted noradrenergic signaling. **Neuropharmacology**, v. 97, p. 149–159, 1 out. 2015b.

SKRIVER, K. et al. Acute exercise improves motor memory: Exploring potential biomarkers. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 116, p. 46–58, 2014.

SMALL, D. M.; JONES-GOTMAN, M.; DAGHER, A. Feeding-induced dopamine release in dorsal striatum correlates with meal pleasantness ratings in healthy human volunteers. **NeuroImage**, v. 19, n. 4, p. 1709–1715, 1 ago. 2003.

SMITH, S. M.; VALE, W. W. **The role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in neuroendocrine responses to stress. Dialogues in Clinical Neuroscience** Taylor & Francis, , 2006.

SOFRONIEW, M. V.; VINTERS, H. V. **Astrocytes: Biology and pathology. Acta Neuropathologica** Springer, , 10 jan. 2010.

SPEAR, L. P. **The adolescent brain and age-related behavioral manifestations.** [s.l: s.n.], v. 24

SPEAR, L. P. **Adolescent alcohol exposure: Are there separable vulnerable periods within adolescence? Physiology and Behavior** Elsevier, , 1 set. 2015.

SPRUIJT, B. M.; VAN HOOFF, J. A. R. A. M.; GISPEN, W. H. **Ethology and neurobiology of grooming behavior. Physiological Reviews** Physiol Rev, , 1992.

STOWMAN, K. World health statistics. **The Milbank Memorial Fund quarterly**, v. 27, n. 2, p. 179–187, 1949.

SVENSSON, M. et al. Forced treadmill exercise can induce stress and increase neuronal damage in a mouse model of global cerebral ischemia. **Neurobiology of Stress**, v. 5, p. 8, 1 dez. 2016.

SWIFT, R. M.; ASTON, E. R. **Pharmacotherapy for alcohol use disorder: Current and emerging therapies. Harvard Review of Psychiatry**, 2015.

T. HARA, K. NAKAMURA, M. M. ET AL. Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. **Nature**, v. 441, p. 885–889, 2006a.

T. HARA, K. NAKAMURA, M. M. ET AL. Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. **Nature**, v. 441, p. 885–889, 2006b.

TAKAHASHI, Y. et al. Oral exposure to high-dose ethanol for 28 days in rats reduces neural stem cells and immediate nascent neural progenitor cells as well as FOS-expressing newborn granule cells in adult hippocampal neurogenesis. **Toxicology Letters**, v. 360, p. 20–32, 1 maio 2022.

TAKEI, N. et al. **A possible link between BDNF and mTOR in control of food intake. Frontiers in Psychology** Frontiers Research Foundation, 25 set. 2014a.

TAKEI, N. et al. A possible link between BDNF and mTOR in control of food intake. **Frontiers in Psychology**, v. 5, n. SEP, p. 107637, 25 set. 2014b.

TAKEI, N.; NAWA, H. **mTOR signaling and its roles in normal and abnormal brain development. Frontiers in Molecular Neuroscience** Frontiers Research Foundation, , 23 abr. 2014.

TANG, M. et al. The interaction between autophagy and neuroinflammation in major depressive disorder: From pathophysiology to therapeutic implications. **Pharmacological research**, v. 168, 1 jun. 2021.

THOMA, R. J. et al. Adolescent Substance Abuse: The Effects of Alcohol and Marijuana on Neuropsychological Performance. **Alcoholism, clinical and experimental research**, v. 35, n. 1, p. 39, 2011.

THOMES PG, ET AL. Proteasome activity and autophagosome content in liver are reciprocally regulated by ethanol treatment. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 417, p. 262–7, 2012.

TIMOFEEVA, E.; HUANG, Q.; RICHARD, D. Effects of Treadmill Running on Brain Activation and the Corticotropin-Releasing Hormone System. **Neuroendocrinology**, v. 77, n. 6, p. 388–405, 1 jun. 2003.

TTBGov - History. Disponível em: <<https://www.ttb.gov/about-ttb/history>>. Acesso em: 14 set. 2023.

UNODC. United Nations Office on Drugs and Crime. Em: **Encyclopedia of Law & Society: American and Global Perspectives**. [s.l: s.n.].

UNTERWALD, E. M. **Naltrexone in the Treatment of Alcohol Dependence**. **Journal of Addiction Medicine** J Addict Med, , set. 2008.

VALDEZ, G. R. et al. Antagonism of corticotropin-releasing factor attenuates the enhanced responsiveness to stress observed during protracted ethanol abstinence. **Alcohol**, v. 29, n. 2, p. 55–60, 2003.

VAN PRAAG, H. Neurogenesis and exercise: Past and future directions. **NeuroMolecular Medicine**, v. 10, n. 2, p. 128–140, 20 jun. 2008.

VANDAEL, D. et al. Corticotropin-releasing factor induces functional and structural synaptic remodelling in acute stress. **Translational Psychiatry 2021 11:1**, v. 11, n. 1, p. 1–12, 7 jul. 2021.

VARLINSKAYA, E. I.; SPEAR, L. P.; DIAZ, M. R. Stress alters social behavior and sensitivity to pharmacological activation of kappa opioid receptors in an age-specific manner in Sprague Dawley rats. **Neurobiology of Stress**, v. 9, p. 124–132, 1 nov. 2018.

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

VERA, B. DEL V.; PILATTI, A.; PAUTASSI, R. M. ELSA cohort 2014: association of age of first drink and progression from first drink to drunkenness on alcohol outcomes in Argentinean college freshmen. <https://doi.org/10.1080/00952990.2019.1608223>, v. 46, n. 1, p. 58–67, 2 jan. 2019.

VÕIKAR, V. et al. Long-term individual housing in C57BL/6J and DBA/2 mice: assessment of behavioral consequences. **Genes, Brain and Behavior**, v. 4, n. 4, p. 240–252, 1 jun. 2005.

WALF, A. A.; FRYE, C. A. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. **Nature Protocols** 2007 2:2, v. 2, n. 2, p. 322–328, 1 mar. 2007.

WALKER, B. M. Conceptualizing withdrawal-induced escalation of alcohol self-administration as a learned, plasticity-dependent process. **Alcohol (Fayetteville, N.Y.)**, v. 46, n. 4, p. 339, jun. 2012.

WALTER, T. J.; CREWS, F. T. Microglial depletion alters the brain neuroimmune response to acute binge ethanol withdrawal. **Journal of Neuroinflammation**, v. 14, n. 1, 20 abr. 2017.

WANG, J. et al. Oxidation of ethanol in the rat brain and effects associated with chronic ethanol exposure. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 35, p. 14444–14449, 27 ago. 2013.

WANG, L.; KLIONSKY, D. J.; SHEN, H. M. The emerging mechanisms and functions of microautophagy. **Nature Reviews Molecular Cell Biology** 2022 24:3, v. 24, n. 3, p. 186–203, 12 set. 2022.

WEISMAN, J. S. et al. Positive Affect and Social Anxiety Across the Lifespan: An Investigation of Age as a Moderator. **Clinical gerontologist**, v. 38, n. 1, p. 1, 1 jan. 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global status report on alcohol and health**. Disponível em: <<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/274603/9789241565639-eng.pdf?ua=1>>. Acesso em: 2 ago. 2022.

WU, Z. Z. et al. Expression of autophagy related genes mTOR, Becline-1, LC3 and p62 in the peripheral blood mononuclear cells of systemic lupus erythematosus. **American Journal of Clinical and Experimental Immunology**, v. 6, n. 1, p. 1, 2017.

WUKITSCH, T. J. et al. Voluntary ethanol consumption during early social isolation and responding for ethanol in adulthood HHS Public Access. **Alcohol**, v. 77, p. 1–10, 2019a.

WUKITSCH, T. J. et al. Voluntary ethanol consumption during early social isolation and responding for ethanol in adulthood. **Alcohol (Fayetteville, N.Y.)**, v. 77, p. 1, 1 jun. 2019b.

XIAO, K. et al. Beneficial effects of running exercise on hippocampal microglia and neuroinflammation in chronic unpredictable stress-induced depression model rats. **Translational Psychiatry** 2021 11:1, v. 11, n. 1, p. 1–12, 6 set. 2021.

XIE, Y. et al. Swimming exercise reverses chronic unpredictable mild stress-induced depression-like behaviors and alleviates neuroinflammation and collapsing response mediator

protein-2-mediated neuroplasticity injury in adult male mice. **Neuroreport**, v. 33, n. 6, p. 272–280, 6 abr. 2022.

XILOURI, M.; STEFANIS, L. Autophagy in the central nervous system: implications for neurodegenerative disorders. **CNS & neurological disorders drug targets**, v. 9, n. 6, p. 701–719, 2 nov. 2010.

YAN, L. et al. Physical exercise mediates a cortical FMRP-mTOR pathway to improve resilience against chronic stress in adolescent mice. **Translational psychiatry**, v. 13, n. 1, 1 dez. 2023.

YAO, W. et al. Activation of BDNF by transcription factor Nrf2 contributes to antidepressant-like actions in rodents. **Translational Psychiatry 2021 11:1**, v. 11, n. 1, p. 1–12, 24 fev. 2021.

YARIBEYGI, H. et al. THE IMPACT OF STRESS ON BODY FUNCTION: A REVIEW. **EXCLI Journal**, v. 16, 2017.

ZHAO, Z. et al. Voluntary Exercise Preconditioning Activates Multiple Antiapoptotic Mechanisms and Improves Neurological Recovery after Experimental Traumatic Brain Injury. **Journal of Neurotrauma**, v. 32, n. 17, p. 1347–1360, 2015a.

ZHAO, Z. et al. Voluntary Exercise Preconditioning Activates Multiple Antiapoptotic Mechanisms and Improves Neurological Recovery after Experimental Traumatic Brain Injury. **Journal of Neurotrauma**, v. 32, n. 17, p. 1347–1360, 2015b.

ZORZO, C. et al. Adult social isolation leads to anxiety and spatial memory impairment: Brain activity pattern of COx and c-Fos. **Behavioural Brain Research**, v. 365, p. 170–177, 3 jun. 2019.

ANEXO 1



Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "EFEITOS NEUROPROTETORES E NEUROREPARADORES DO EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE OS DANOS CAUSADOS PELO CONSUMO DE ETANOL DURANTE A ADOLESCÊNCIA", protocolada sob o CEUA nº 6005080818, sob a responsabilidade de Thamires Righi - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Paulo (CEUA/UNIFESP) na reunião de 13/09/2018.

We certify that the proposal "NEUROPROTECTOR AND NEUROREPARATOR EFFECTS OF PHYSICAL EXERCISE ON DAMAGE CAUSED BY ETHANOL CONSUMPTION DURING ADOLESCENCE", utilizing Heterogenics mice, protocol number CEUA 6005080818, under the responsibility of Thamires Righi - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was approved by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of São Paulo (CEUA/UNIFESP) in the meeting of 09/13/2018.

Finalidade da Proposta: *Pesquisa (Acadêmica)*

Vigência da Proposta: de 01/2019 a 12/2022

Área: *Farmacologia/farmacologia*

Origem: *Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia - CEDEME*

Espécie: *Camundongos heterogênicos*

sexo: *Machos*

idade: *28 a 120 dias*

N: *---*

Linhagem: *Suíços*

Peso: *5 a 60 g*

Local do experimento: Os animais serão transferidos para o biotério de experimentação animal Leal Prado - UNIFESP

São Paulo, 13 de setembro de 2018

Profa. Dra. Monica Levy Andersen
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Paulo

Profa. Dra. Daniela Santoro Rosa
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Paulo

MATERIAIS SUPLEMENTARES

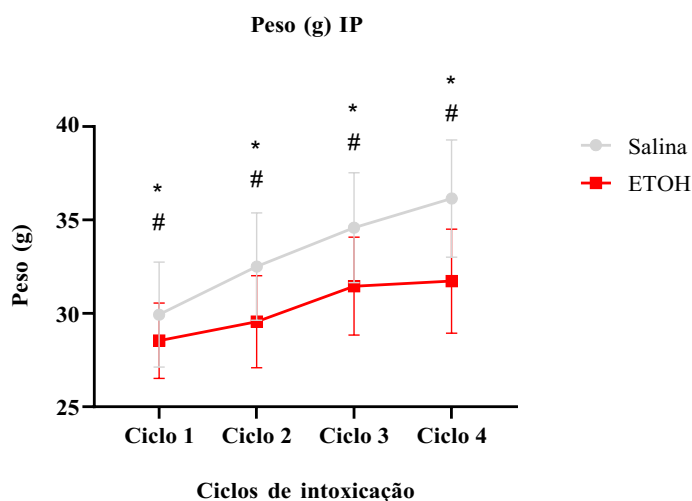
EXPERIMENTO 5.1:

Peso dos animais durante os ciclos de intoxicação:

Na análise do peso dos animais durante os ciclos de intoxicação, a distribuição que mais aderiu foi a Normal, com $AIC=394,30$. Os resultados mostraram que houve efeito do tempo [$F(1,81) = 208,7$, $p < 0,001$], do tratamento [$F(1,27) = 9,25$, $p = 0,005$] e efeito da interação tempo*tratamento ($F(1,81) = 18,15$; $p < 0,001$). Analisando o fator tempo, observamos que o peso dos animais aumentou gradativamente ao longo das semanas, independentemente da exposição ao etanol (Semana 1: $29,2 \pm 0,5$; Semana 2: $31,0 \pm 0,5$; Semana 3: $33,0 \pm 0,5$; Semana 4: $33,9 \pm 0,5$). Em relação ao tratamento, observou-se que os animais que receberam injeção de salina apresentaram peso maior do que os animais que receberam injeção de etanol (Salina: $33,3 \pm 0,703$; ETOH: $30,3 \pm 0,679$).

Em conjunto esses resultados indicam que, apesar dos animais do grupo salina apresentarem peso inicial diferente dos animais do grupo etanol, ambos os grupos apresentaram aumento no peso ao longo das semanas, o que é compatível com o observado na transição da fase da adolescência (semana 1; PDN:28) para a fase adulta (semana 4; PDN:58). Entretanto, esse aumento no peso foi mais evidente e constante no grupo salina do que no grupo ETOH, evidenciando que os ciclos de intoxicação ao ETOH podem ser prejudiciais no desenvolvimento e ganho de peso dos animais.

Figura 63. Avaliação do efeito do tratamento com etanol e salina, no peso dos animais, durante o protocolo de intoxicação alcóolica por IP. Foi observado efeito do tratamento (salina x etanol), tempo (ciclos) e interação entre eles. * Maior aumento do grupo salina em relação ao ETOH. #Aumento do peso ao longo das semanas.

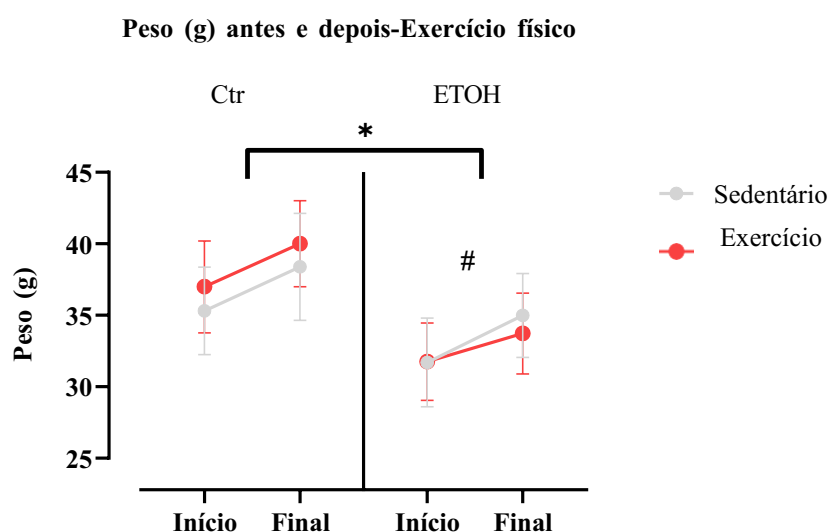


Peso antes e depois do exercício:

Em relação ao peso dos animais, a distribuição que melhor aderiu aos dados foi a Gamma, com AIC = 189,07. Os resultados mostraram que houve efeito do tratamento [X^2 (1) = 7,78, $p < 0,005$] e da interação treino*tempo (X^2 (1)=17,1, $p < 0,001$), entretanto não houve efeito dos fatores treino [X^2 (1) = 0,219, $p = 0,640$] e tempo [X^2 (1) = 1,388, $p = 0,239$] isoladamente. A análise de Post Hoc do fator tratamento, demonstrou que o peso dos animais do grupo ETOH foi menor do que o grupo Salina [ETOH: $34,8 \pm 1,18$ g; Salina: $39,3 \pm 1,10$ g]. Em relação ao treino*tempo observou-se que o grupo sedentário aumentou de peso durante o tempo do protocolo de exercício físico (Sedentário antes: $36,3 \pm 1,17$ g; Sedentário depois: $37,1 \pm 1,17$ g).

Em conjunto esses resultados indicam que a intoxicação de ETOH pode ter afetado no peso dos animais, levado a diminuição no ganho de peso durante a transição da adolescência para a fase adulta. Durante as quatro semanas de treinamento, os animais que ficaram sedentários tiveram um aumento de peso em relação aos que se exercitaram, indicando que o exercício físico teve efeito na manutenção do peso desses animais.

Figura 64. Avaliação do efeito do tratamento com etanol e salina, no peso dos animais, após os protocolos de intoxicação alcóolica por IP e exercício físico. Foi observado efeito do tratamento (salina/ctr x etanol) e da interação tempo*exercício (exercício início x exercício final). *Maior peso dos animais do grupo ctr em relação ao grupo ETOH. # Aumento no peso do grupo sedentário depois de 4 semanas sem realizar o protocolo de exercício físico.



EXPERIMENTO 5.2

5.2.1. Comparação no consumo de ETOH entre os grupos, nas semanas iniciais

(semana 1 e 2):

Figura 65. Gráfico do consumo de etanol no IA2BC durante o protocolo de consumo forçado (semana 1). Nele pode-se observar que não existia diferença no consumo entre os grupos de animais (vapor e ar).

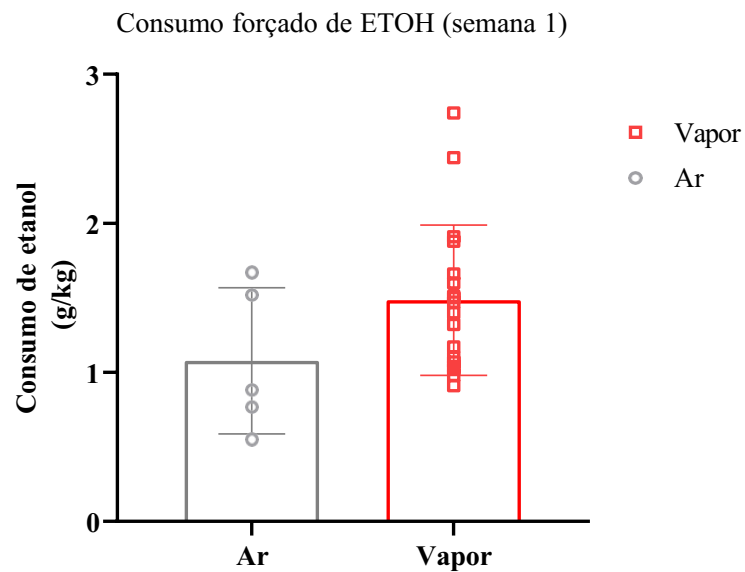


Figura 66. Gráfico do consumo de etanol no IA2BC durante a habituação ao IA2BC (semana 2). Nele pode-se observar que não existiu diferença no consumo entre os grupos de animais (vapor e ar).

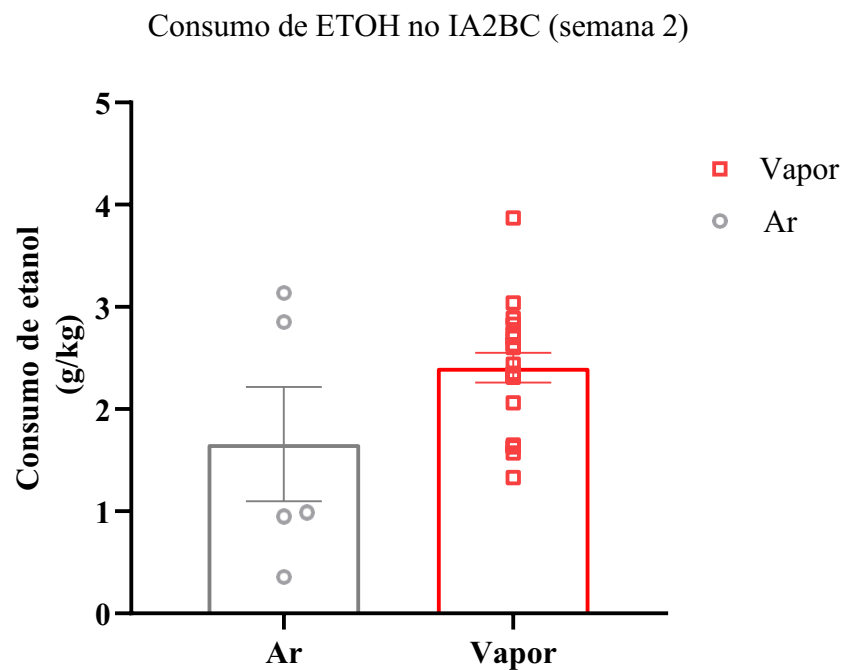
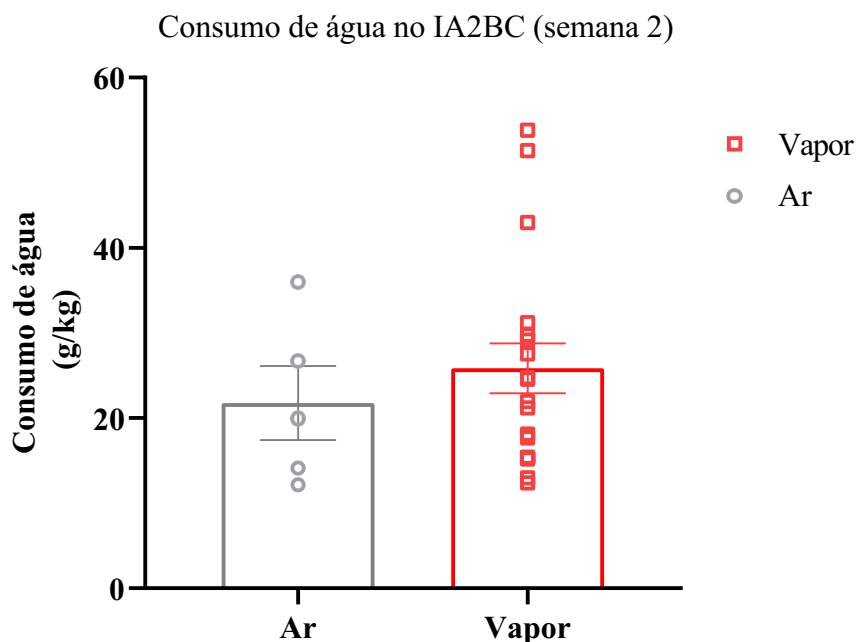


Figura 67. Gráfico do consumo de água no IA2BC durante a habituação ao IA2BC (semana 2). Nele pode-se observar que não existiu diferença no consumo entre os grupos de animais (vapor e ar).

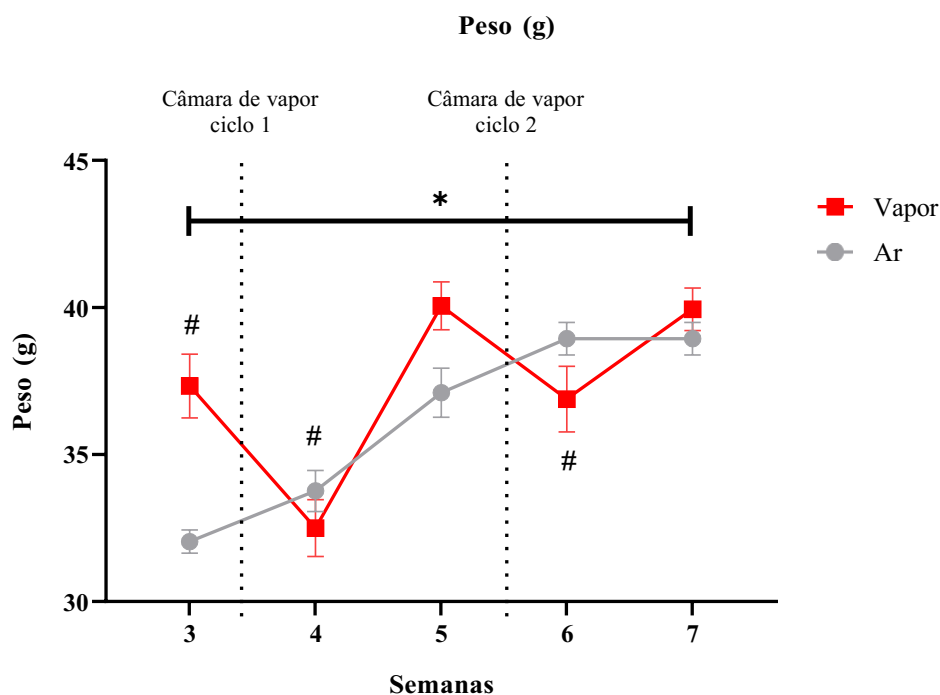


5.2.2: Quantificação das alterações no padrão de peso entre os animais que passaram pelos ciclos de intoxicação de etanol versus os animais que não passaram pela intoxicação durante a adolescência, assim como após o protocolo de exercício físico, somente entre os animais exercitados e sedentário.

A figura 68 representa os valores do peso dos animais antes, durante e após os ciclos do protocolo de câmara de vapor. Para o peso dos animais, a distribuição Normal foi a que melhor aderiu aos dados, com AIC =497,37. Os resultados mostraram que houve efeito do tempo [$F(4,84) = 57,62$, $p < 0,001$] e interação entre os fatores [$F(4,84) = 17,93$, $p < 0,001$], mas não houve efeito do grupo [$F(1,21) = 0,46$, $p = 0,505$]. Analisando o fator tempo, o peso dos animais, em média aumentou comparando a semana 3 e 7 ($\beta = 4,75$; $p < 0,001$) (Sem 3: $34,69 \pm 0,93$ g vs Sem 7: $39,44 \pm 0,93$ g). A interação mostra que para o grupo VAPOR houve diminuição de peso após os ciclos de vapor de etanol (Sem 3: $37,33 \pm 0,86$ g vs Sem 4: $32,50 \pm 0,86$ g, Bonferroni $p < 0,001$; Sem 5: $40,06 \pm 0,86$ g vs Sem 6: $36,89 \pm 0,86$ g, Bonferroni $p < 0,001$), entretanto essas diferenças não foram observadas para o grupo AR (Sem 3: $32,04 \pm 1,64$ g vs Sem 4: $33,76 \pm 1,64$ g, Bonferroni $p = 1,000$; Sem 5: $37,10 \pm 1,64$ g vs Sem 6: $38,94 \pm 1,64$ g, Bonferroni $p = 1,000$). Apesar da diminuição do peso após a exposição ao vapor de etanol, comparando as

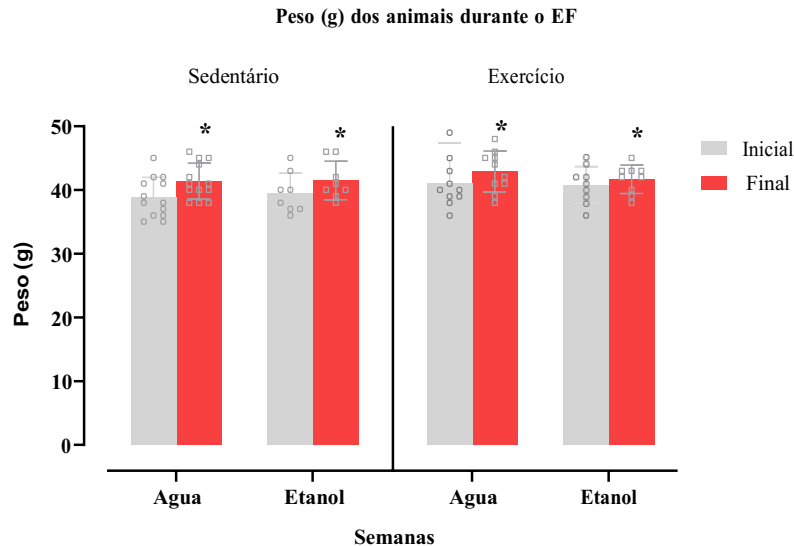
semanas 3 e 7, os animais do grupo VAPOR mostraram um aumento de peso, em média (Sem 3: $37,33 \pm 0,86$ g vs Sem 7: $39,94 \pm 0,86$ g Bonferroni $p < 0,001$), bem como os animais do grupo AR (Sem 3: $32,04 \pm 1,64$ g vs Sem 7: $38,94 \pm 1,64$ g, Bonferroni $p < 0,001$).

Figura 68. Gráfico do peso dos animais durante o protocolo de intoxicação à câmara de vapor. Nele pode-se observar que os animais expostos à câmara de VAPOR apresentaram menor peso logo após a exposição ao vapor e que o peso dos animais aumentou, em ambos os grupos, ao longo do tempo. *Aumento do peso, em ambos os grupos, ao longo das semanas. # Diminuição do peso do grupo vapor, na semana 4 e 6, em comparação à semana 3.



Também foi comparado o peso dos animais exercitados e sedentários na semana anterior ao início do protocolo de exercício físico com a semana final a esse protocolo. A distribuição que melhor aderiu aos dados foi a Gamma, com AIC = 330,74. Os resultados, na figura 69, mostram que houve efeito do tempo [$X^2(1) = 51,73$, $p < 0,001$], entretanto não houve efeito de grupo [$X^2(1) = 1,20$, $p = 0,273$] e interação entre os fatores [$X^2(1) = 2,78$, $p = 0,095$]. Analisando o fator tempo, observamos que o peso dos animais aumentou após o exercício físico independentemente da exposição ao etanol e exercício ($\beta = 1,92$, $p < 0,001$) [Antes: $40,13 \pm 0,62$ g; Depois: $42,05 \pm 0,63$ g].

Figura 69. Gráfico do peso dos animais após o protocolo de exercício físico. Nele pode-se observar que os animais aumentaram de peso ao longo do tempo, independentemente do tratamento e treinamento. *Aumento do peso final em comparação ao inicial ao longo das semanas.



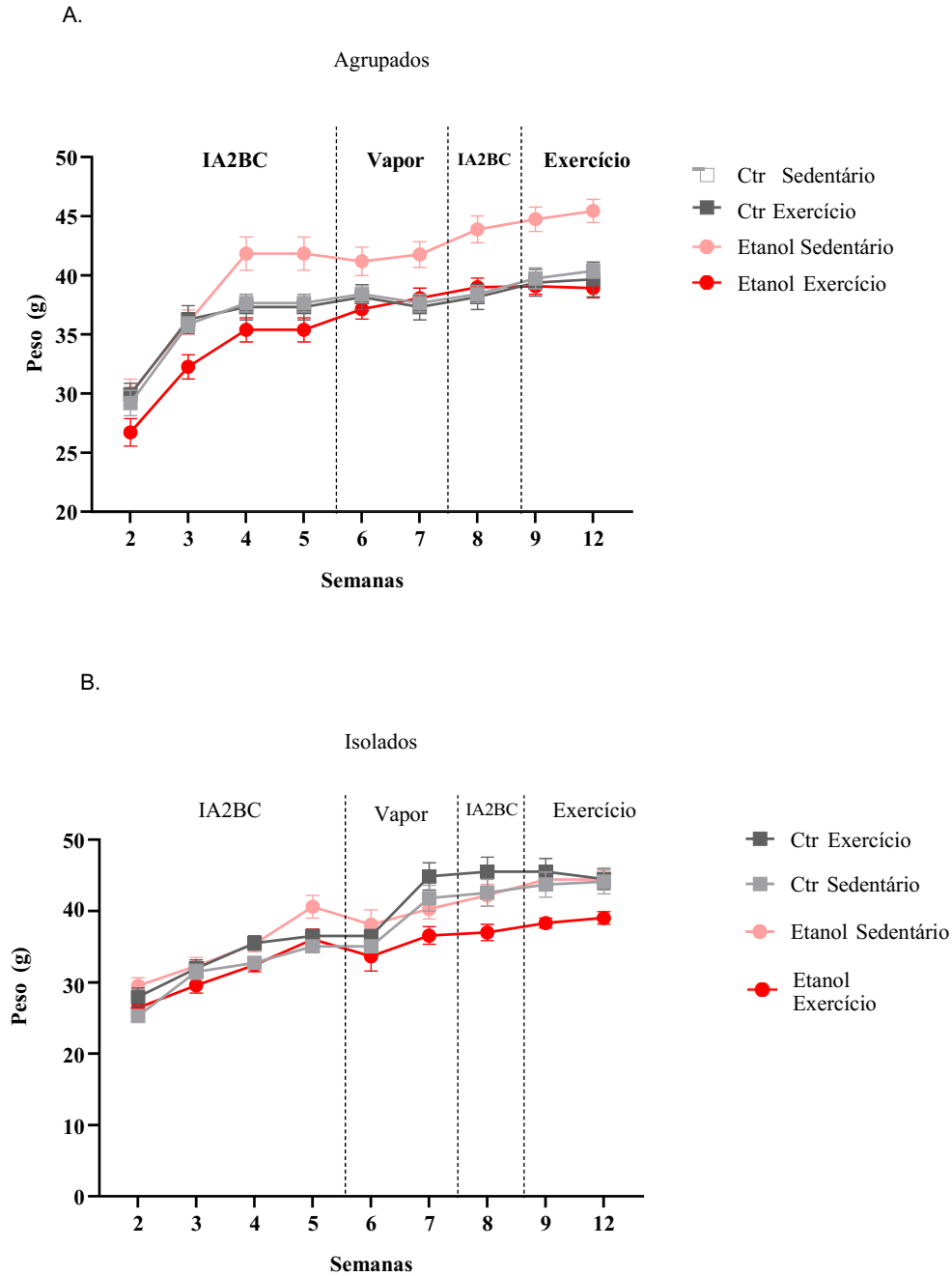
EXPERIMENTO 5.3

Verificação do peso dos animais ao longo das semanas de consumo no modelo IA2BC, após a exposição à câmara de vapor e antes e depois do exercício físico

O gráfico representativo de todo o protocolo experimental do peso dos animais, da semana 2 até a semana 12, foi apresentado abaixo, na figura 70. Nesse gráfico pode-se observar a separação e identificação de cada etapa desse protocolo e, na sequência, o texto descreverá e apresentará os resultados de cada uma dessas etapas separadamente para melhor compreensão dos objetivos e dos resultados específicos obtidos.

Figura 70. Gráfico do peso dos animais agrupados (A) e isolados (B) ao longo de todo o experimento 3. Nele pode-se observar a separação e identificação de cada etapa desse experimento 3, durante o protocolo de isolamento, de consumo e intoxicação ao ETOH e do exercício físico.

Peso dos animais ao longo de todo o experimento



Para a certificação de que os animais partiriam do mesmo peso, realizamos uma análise do peso na semana 2. Realizamos uma ANOVA de três vias que mostrou que não houve efeito do consumo [$F(1,66) = 0,007$, $p = 0,930$], de homecage [$F(1,66) = 2,88$, $p = 0,094$] e treinamento [$F(1,66) = 0,61$, $p = 0,436$]. Isso indica que os grupos possuíam pesos semelhantes no início do protocolo [Agrupados (Ctr Sedent: $29,20 \pm 1,48$ g; Ctr Exercício: $29,93 \pm 1,48$ g; EtOH Sedent: $30,07 \pm 1,21$; EtOH Exercício $26,70 \pm 1,40$) Isolados (Ctr Sedent: $25,30 \pm 1,48$ g; Ctr Exercício: $27,94 \pm 1,40$ g; EtOH Sedent: $29,52 \pm 1,32$; EtOH Exercício $26,43 \pm 1,32$)].

Para o peso dos animais ao longo do acesso intermitente de etanol (semana 2 até 5), a distribuição Gamma foi a que melhor aderiu aos dados (AIC = 812,47). Os resultados mostraram que houve efeito do tempo [$X^2(3) = 587,97$, $p < 0,001$] e interação entre os tempo*homecage [$F(3) = 28,55$, $p < 0,001$], mas não houve efeito do grupo [$F(1) = 1,41$, $p = 0,234$].

Analisando o fator tempo, o peso dos animais, em média, aumentou comparando a semana 2 e 5 ($\beta = 10,12$; $p < 0,001$) (Sem 2: $29,11 \pm 1,05$ g vs Sem 5: $39,23 \pm 1,08$ g).

A interação mostrou que os animais do grupo isolado apresentaram, em média, menor valor no peso comparando a semana 2 com as semanas 3 ($\beta = -2,77$; $p < 0,001$) e 4 ($\beta = -4,10$; $p < 0,001$) em relação aos animais agrupados [Agrupados (Sem 2: $29,47 \pm 1,43$ g ; Sem 3: $35,21 \pm 1,46$; Sem 4: $39,61 \pm 1,48$); Isolados (Sem 2: $28,75 \pm 1,53$ g ; Sem 3: $31,72 \pm 1,55$ g; Sem 4: $34,79 \pm 1,56$ g)]. Não houve diferença entre os grupos em relação à última semana [Sem 5 (Agrupados: $39,61 \pm 1,48$ g; Isolados: $38,86 \pm 1,58$)].

Observou-se que no grupo Agrupado o peso se manteve estável entre as semanas 4 e 5 (Bonferroni $p = 1,000$), enquanto para o grupo isolado houve um aumento (Bonferroni $p < 0,001$). Esses resultados sugerem que os animais mantidos em isolamento social apresentam padrão de aumento de peso diferente dos animais Agrupados, entretanto, ambos os grupos apresentaram aumento no peso esperado durante a transição da fase da adolescência (semana 3; PDN:28) para a fase adulta (semana 5; PDN:58).

Em relação ao peso dos animais antes e após os ciclos de vapor, a distribuição Gamma foi a que melhor aderiu aos dados (AIC = 377,56). Os resultados mostraram que houve efeito do tempo [$X^2(1) = 64,75$, $p < 0,001$] e interação entre o Tempo*Homecage [$X^2(1) = 8,82$, $p = 0,003$], mas não houve efeito do homecage separadamente [$X^2(1) = 0,24$, $p = 0,622$]. Analisando o fator tempo, o peso dos animais, em média, aumentou comparando a semana 5 e 8 ($\beta = 2,23$; $p < 0,001$) (Sem 5: $39,66 \pm 1,28$ g vs Sem 8: $41,92 \pm 1,29$ g).

O peso dos animais também foi pesado na semana anterior ao início do protocolo de exercício físico e no final desse protocolo. Em relação ao peso dos animais, a distribuição que

melhor aderiu aos dados foi a Gamma (AIC =592,23). Os resultados apresentados na figura 71 mostraram que não houve efeito do tempo [$X^2(1) = 2,88$, $p = 0,090$], do treinamento [$X^2(1) = 3,38$, $p = 0,066$], do consumo [$X^2(1) = 0,14$, $p = 0,699$] ou da homecage [$X^2(1) = 2,24$, $p = 0,134$]. Esses dados indicam que, em média, o peso dos animais se manteve o mesmo antes e após o exercício físico [Antes: $42,53 \pm 0,79$ g; Depois: $42,77 \pm 0,79$ g].

Entretanto, os resultados também demonstraram que houve interação entre Treinamento*consumo [$X^2(1) = 4,78$, $p = 0,029$]. A interação mostra que os animais do grupo etanol, que passaram pelo exercício apresentaram em média, peso menor do que os animais sedentários deste mesmo grupo [Etanol (Exercício $39,17 \pm 1,63$ g; Sedentário: $45,53 \pm 1,36$ g)].

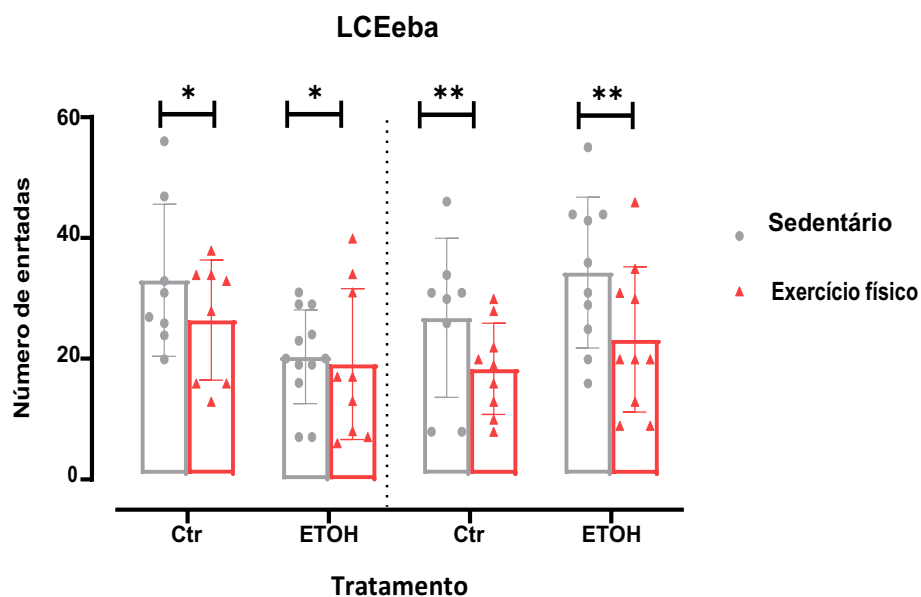
Quantificação complementar dos parâmetros: espaço-temporal e avaliação de risco do teste LCE (LCEeba, LCEtba, LCEtbf, LCEttf, LCEmd, LCEed); testes complementares do campo aberto (CAzc e CAzp) e cálculo do índice de exploração dos objetos no teste do Reconhecimento de objeto (%TE).

- **LCeba:**

Em relação ao número de entradas nos braços abertos, a distribuição que melhor aderiu aos dados foi a Poisson (AIC =725,81). Os resultados mostraram que não houve efeito do homecage [$X^2(1) = 0,175$, $p = 0,676$], consumo [$X^2(1) = 1,55$, $p = 0,213$], mas houve efeito do treinamento [$X^2(1) = 34,49$, $p < 0,001$].

Em relação ao treinamento, após o post Hoc de Bonferroni, foi possível observar que ocorreu diminuição no número de entradas nos braços abertos nos animais exercitados em comparação aos sedentários (Bonferroni $p < 0,001$) [exercício: $21,1 \pm 0,770$; Sedentários: $27,9 \pm 0,876$].

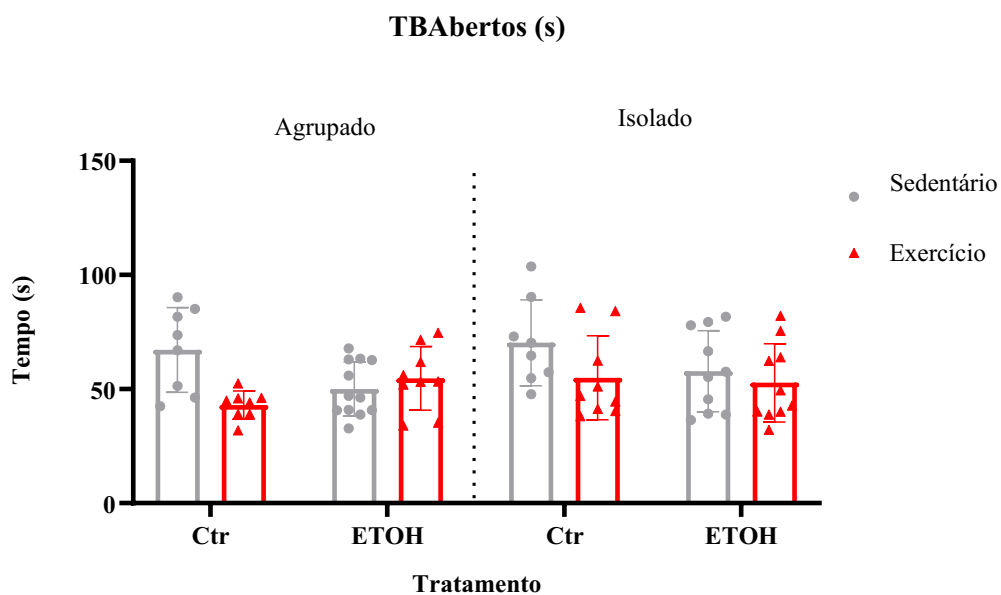
Figura 71. Gráfico do número de entradas no braço aberto. *Diminuição no número de entradas nos braços abertos pelos animais exercitados quando comparados aos sedentários.



- **LCEtba:**

Em relação ao tempo total no braço aberto, a distribuição que melhor aderiu aos dados foi a Gamma (AIC =658,62). Os resultados apresentados na figura 72, para o tempo no braço aberto, mostraram que não houve efeito do homecage [$X^2(1) = 0,55$, $p = 0,455$], consumo [$X^2(1) = 1,66$, $p = 0,197$], do treinamento [$X^2(1) = 2,77$, $p = 0,096$] e também não houve efeito em nenhuma das interações.

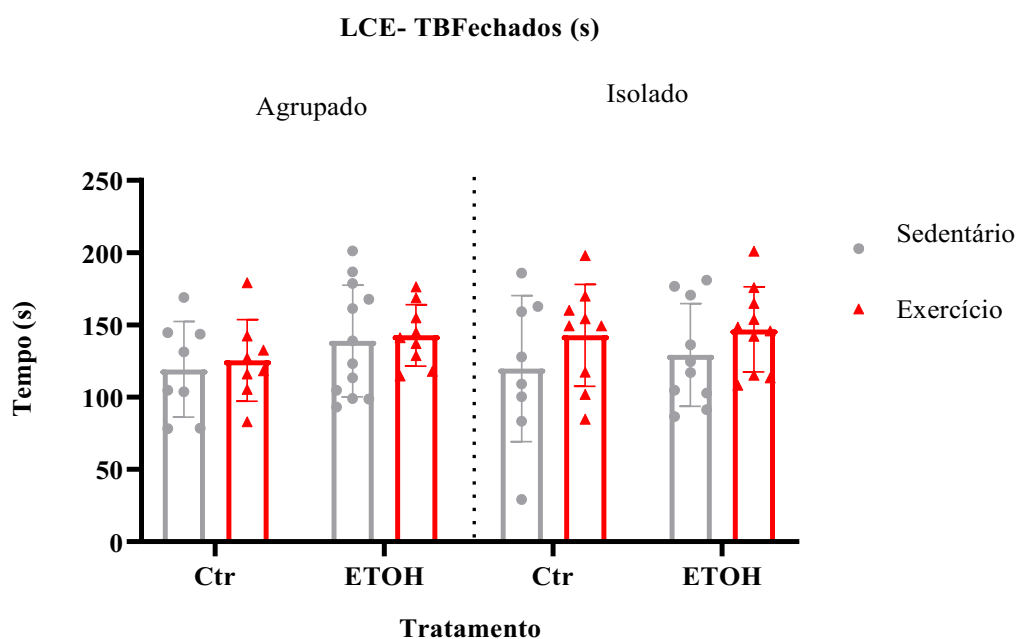
Figura 72. Gráfico do tempo total no braço aberto. Nele pode-se observar que não houve efeito de nenhum dos fatores (homecage, tratamento e treinamento).



- **LCETbf:**

Em relação ao tempo total no braço fechado (LCETbf), a distribuição que melhor aderiu aos dados foi a Normal (AIC =745,22). Os resultados apresentados na figura 73, para o tempo no braço fechado, mostraram que não houve efeito do homecage [$X^2(1) = 0,138$, $p = 0,709$], consumo [$X^2(1) = 2,38$, $p = 0,123$], do treinamento [$X^2(1) = 2,41$, $p = 0,120$] e também não houve efeito em nenhuma das interações.

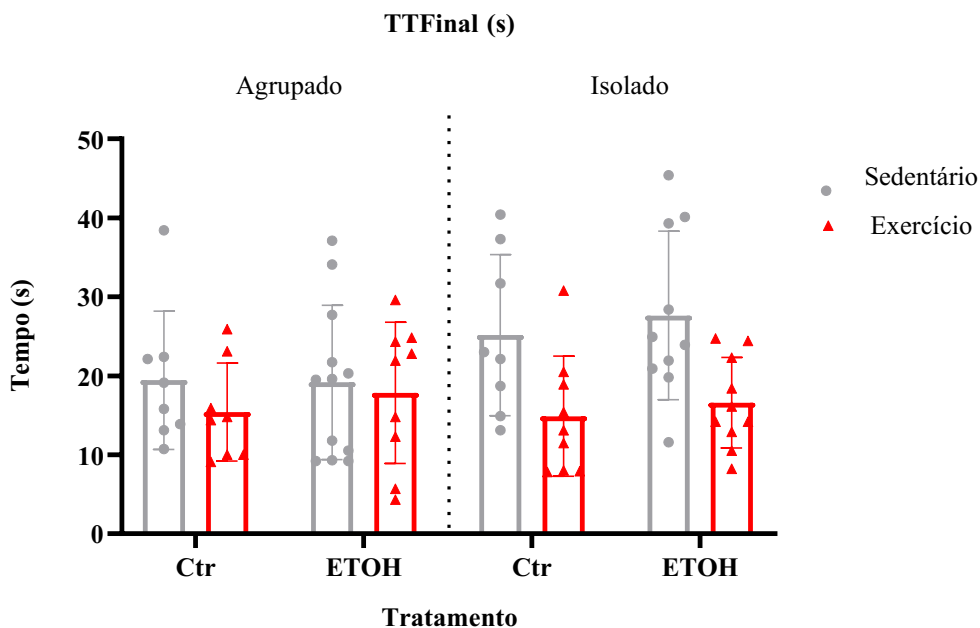
Figura 73. Gráfico do tempo total no braço fechado. Nele pode-se observar que não houve efeito de nenhum dos fatores (homecage, tratamento e treinamento).



- **LCETtf:**

Em relação ao tempo total no terço final do braço aberto (LCETtf), a distribuição que melhor aderiu aos dados foi a Normal (AIC =618,64). Os resultados apresentados na figura 74, para o tempo no terço final, mostraram que não houve efeito do homecage [$X^2(1) = 0,729$, $p = 0,393$], consumo [$X^2(1) = 0,58$, $p = 0,446$], do treinamento [$X^2(1) = 5,68$, $p = 0,017$] e também não houve efeito em nenhuma das interações.

Figura 74. Gráfico do tempo total no terço final do braço aberto. Nele pode-se observar que não houve efeito de nenhum dos fatores (home case, tratamento e treinamento).

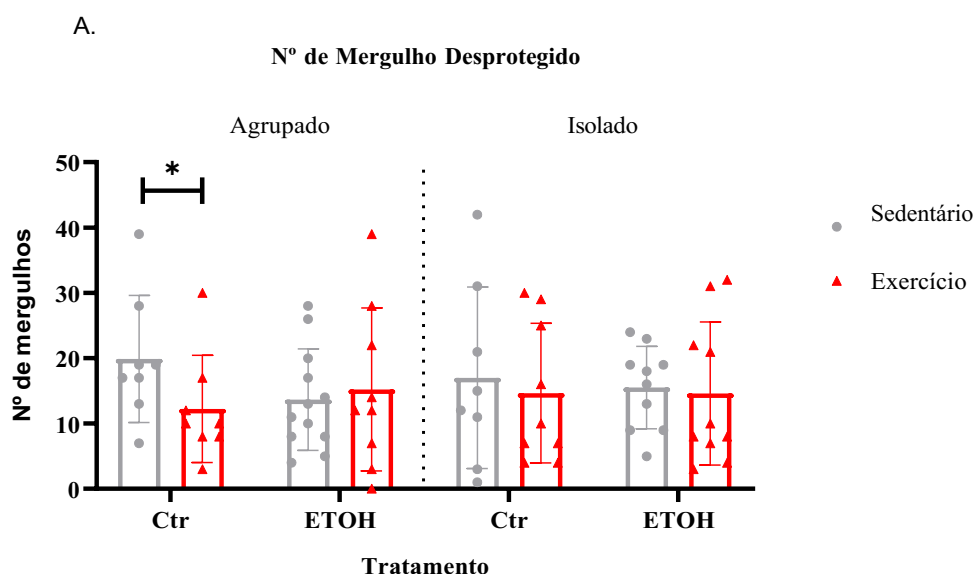


- **LCEmd:**

Em relação ao número de mergulhos desprotegidos (LCEmd), a distribuição que melhor aderiu aos dados foi a Poisson (AIC = 783,50). Os resultados mostraram que não houve efeito do home cage [$X^2(1) = 0,041$, $p = 0,838$], consumo [$X^2(1) = 1,704$, $p = 0,192$] e do treinamento [$X^2(1) = 6,36$, $p = 0,012$], mas houve efeito da interação consumo*treinamento [$X^2(1) = 8,33$, $p = 0,004$].

Em relação à interação, após o post Hoc de Bonferroni, foi possível observar que ocorreu uma diminuição no número de mergulhos desprotegidos entre os animais ctr*exercício quando comparado aos animais ctr*sedentário ($p_{\text{bonferroni}} = 0,002$) [Ctr*exercício: $13,5 \pm 0,889$; Água*sedentário: $18,4 \pm 1,07$].

Figura 75. A. Gráfico do número de mergulhos desprotegidos. Nele pode-se observar que houve efeito da interação consumo*treinamento. *Diminuição do número de mergulhos desprotegidos entre ctr *exercício e ctr*sedentário.

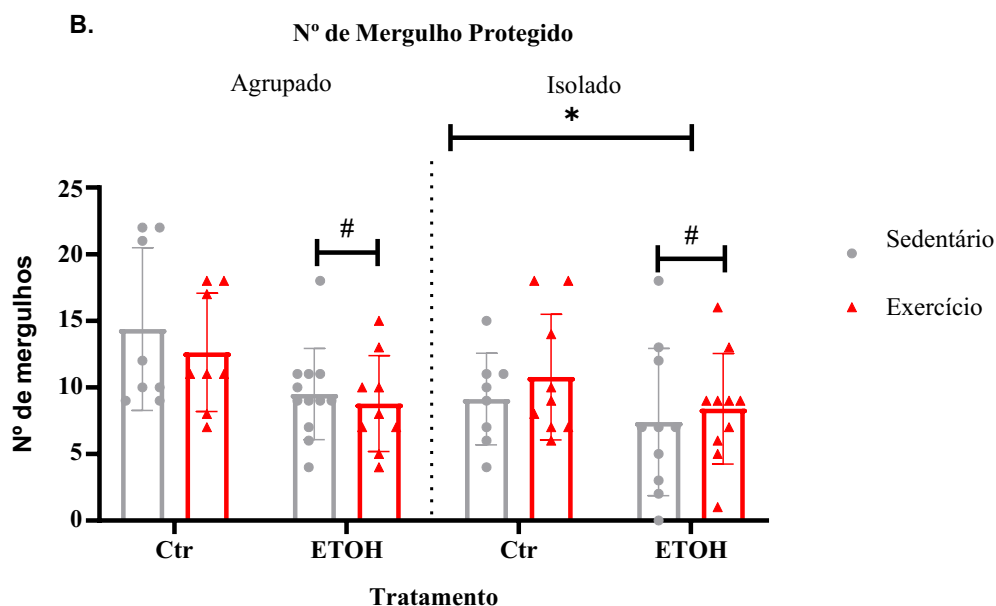


- **LCEmp:**

Em relação ao número de mergulhos protegidos (LCEmp), a distribuição que melhor aderiu aos dados foi a Poisson (AIC =452,72). Os resultados mostraram que houve efeito do homecage [$X^2(1)=10,17$, $p=0,001$] e consumo [$X^2(1)=18,63$, $p<0,001$], mas não houve efeito do treinamento [$X^2(1)=0,003$, $p=0,952$] e das interações. Em relação à homecage, após o PostHoc de Bonferroni, foi possível observar que ocorreu uma diminuição no número de mergulhos protegidos entre os isolados quando comparado aos animais sociáveis ($p_{\text{bonferroni}}=0,001$) [Isolados: $8,93 \pm 0,495$; Ctr*sedentário: $11,32 \pm 0,567$].

Em relação ao consumo, após o post Hoc de Bonferroni, foi possível observar que ocorreu uma diminuição no número de mergulhos protegidos entre os animais etanol quando comparado aos animais ctr ($p_{\text{bonferroni}}<0,001$) Ctr: $11,7 \pm 0,598$; ETOH: $8,52 \pm 0,457$].

Figura 76. B. Gráfico do número de mergulhos protegidos. Nele pode-se observar que houve efeito dos fatores homecage e consumo. *Diminuição do número entre isolados em relação aos agrupados. # Diminuição no número de mergulhos entre etanol x ctr.

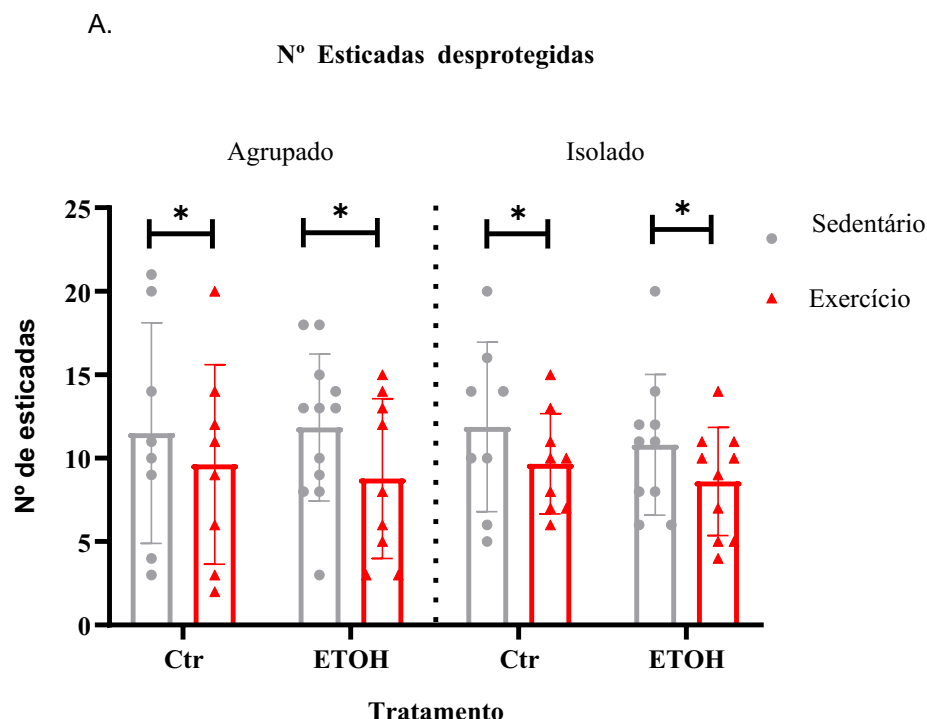


- **LCEed:**

Em relação ao número de esticadas desprotegidas (LCEed), a distribuição que melhor aderiu aos dados foi a Poisson (AIC =465,0). Os resultados mostraram que não houve efeito do homecage [$X^2(1) = 0,069$, $p = 0,792$] e do consumo [$X^2(1) = 0,77$, $p = 0,378$], mas houve efeito do treinamento [$X^2(1) = 9,58$, $p = 0,002$]. Não houve efeito das interações.

Em relação ao treinamento, após o PostHoc de Bonferroni, foi possível observar que ocorreu uma diminuição no número de esticadas desprotegidas entre os animais do grupo exercício quando comparado aos sedentários ($p_{\text{bonferroni}} = 0,002$) [Exercício: $9,17 \pm 0,507$; Sedentário: $11,5 \pm 0,558$].

Figura 77. (A) Gráfico do número de esticadas desprotegidas. Nele pode-se observar que houve efeito do treinamento. *Diminuição no número de esticadas nos animais que fizeram exercício físico em relação aos sedentários

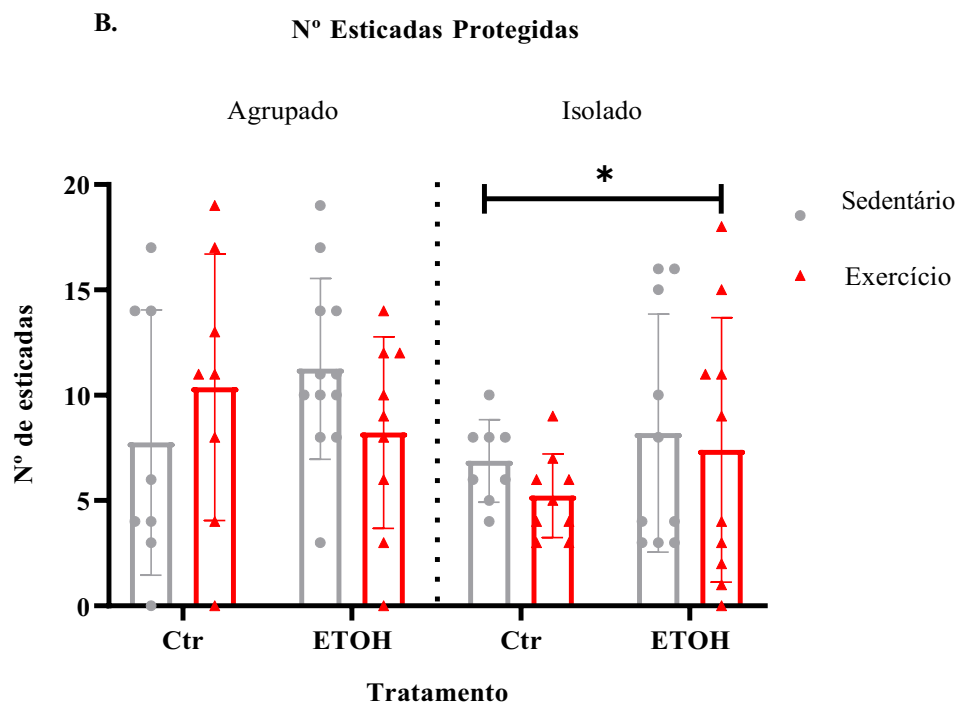


- **LCEep:**

Em relação ao número de esticadas protegidas (LCEep), a distribuição que melhor aderiu aos dados foi a Poisson (AIC =509,88). Os resultados mostraram que houve efeito do homecage [$X^2(1)=13,84$, $p<0,001$], mas não houve efeito do consumo [$X^2(1)=3,27$, $p=0,071$], do treinamento [$X^2(1)=1,14$, $p=0,285$] e das interações.

Em relação à homecage, após o PostHoc de Bonferroni, foi possível observar que ocorreu uma diminuição no número de esticadas protegidas entre os animais do grupo isolado quando comparado aos agrupados ($p_{\text{bonferroni}}<0,001$) [Isolado: $6,92 \pm 0,433$; Agrupado: $9,40 \pm 0,507$].

Figura 78. (B) Gráfico do número de esticadas protegidas. Nele pode-se observar que houve efeito do homecage. *Diminuição no número de esticadas nos animais isolados em relação aos agrupados.



- **CAzc e CAzp:**

Em relação ao tempo total na zona central (s), a distribuição que melhor aderiu aos dados foi a Gamma (AIC =783,04). Os resultados apresentados na figura 79 (A), para o tempo na zona central, mostraram que houve efeito do homecage [$X^2(1) = 11,46$, $p < 0,001$] e consumo [$X^2(1) = 7,75$, $p = 0,005$], mas não houve efeito do treinamento [$X^2(1) = 0,0132$, $p = 0,908$] e também não houve efeito em nenhuma das interações.

Em relação à homecage, após o post Hoc de Bonferroni, foi possível observar que ocorreu uma diminuição no tempo de permanência na zona central entre os animais isolados quando comparado aos agrupados ($p_{\text{bonferroni}} = 0,001$) [Isolado: $146 \pm 7,07$; agrupado: $184 \pm 8,96$].

Em relação ao consumo, após o post Hoc de Bonferroni, foi possível observar que ocorreu uma diminuição no tempo de permanência na zona central entre os animais do grupo etanol quando comparado ao grupo controle ($p_{\text{bonferroni}} = 0,008$) [Etanol: $150 \pm 6,8$; Controle: $181 \pm 9,16$].

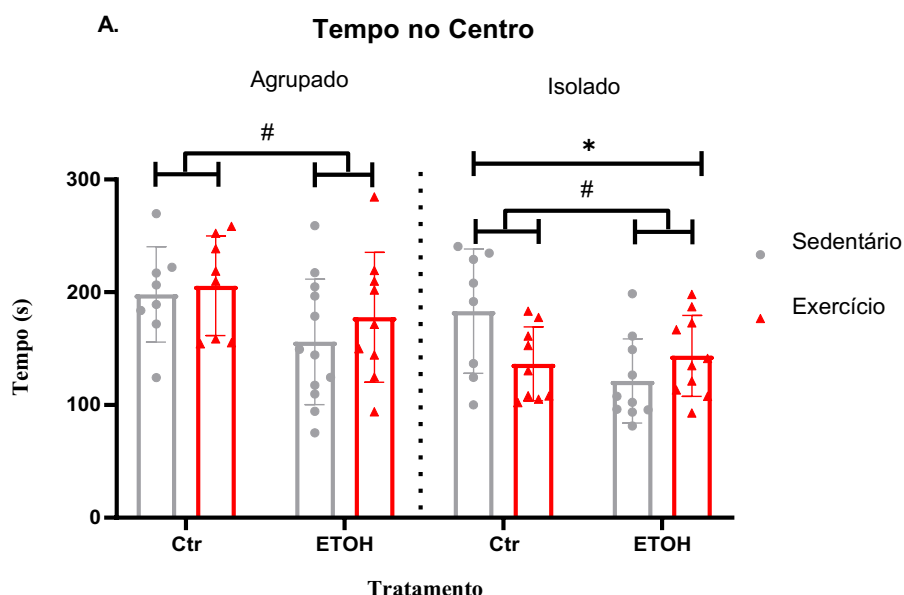
Para o tempo total na zona periférica (s), a distribuição que melhor aderiu aos dados foi a Normal (AIC =789,25). Os resultados apresentados na figura 79 (B), para o tempo na zona periférica, mostraram que houve efeito do homecage [$X^2(1) = 13,09$, $p < 0,001$] e consumo [$X^2(1)$

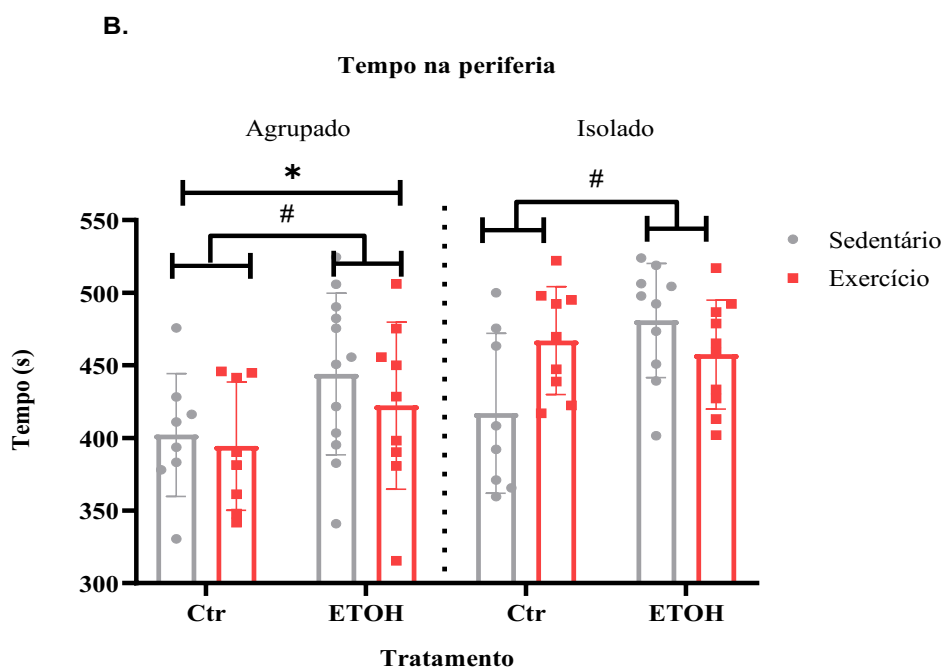
=7,95, $p = 0,005$], mas não houve efeito do treinamento [$X^2(1) = 0,0132$, $p = 0,908$] e também não houve efeito em nenhuma das interações.

Em relação à homecage, após o post Hoc de Bonferroni, foi possível observar que ocorreu uma diminuição no tempo de permanência na zona periférica entre os animais agrupados quando comparado aos isolados ($p_{\text{bonferroni}} < 0,001$) [Isolado: $456 \pm 7,75$; Agrupado: $416 \pm 7,83$].

Em relação ao consumo, após o post Hoc de Bonferroni, foi possível observar que ocorreu uma diminuição no tempo de permanência na zona periférica entre os animais do grupo controle quando comparado ao grupo etanol ($p_{\text{bonferroni}} = 0,006$) [Etanol: $451 \pm 7,37$; Controle: $420 \pm 8,19$].

Figura 79. **(A)** Gráfico do tempo de permanência na zona central do CA. Nele pode-se observar que houve efeito do fator homecage e consumo. *Diminuição no tempo entre os animais do grupo isolado em relação ao agrupado. # Diminuição no tempo de permanência entre os animais que consumiram ETOH em relação ao controle. **(B)** Gráfico do tempo de permanência na zona periférica do CA. Nele pode-se observar efeito do fator homecage e consumo. *Diminuição no tempo entre os animais agrupados em relação ao isolado. # Diminuição no tempo de permanência entre os animais do grupo controle em relação ao grupo ETOH.

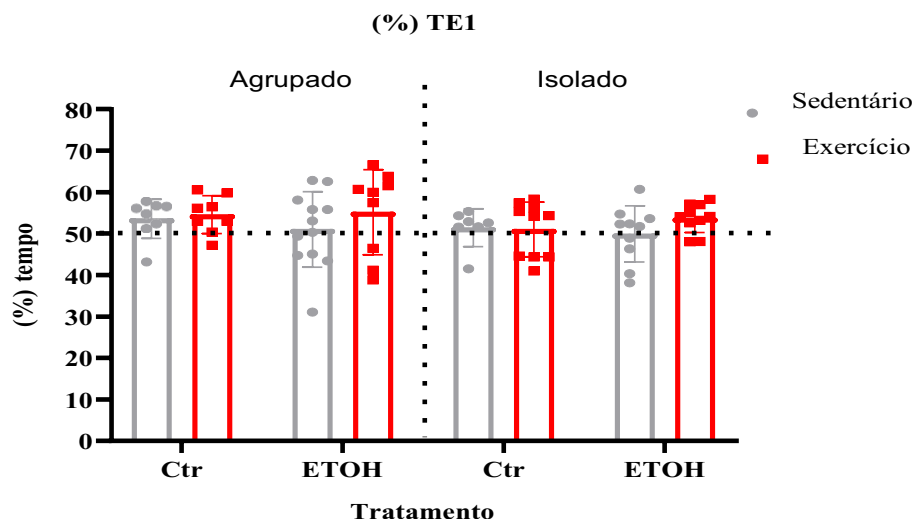




%TE na habituação

A porcentagem do tempo de exploração para a habituação (%TE1), aderiu melhor à distribuição (AIC =503,78). Os resultados apresentados na figura 80(B), para (%TE1, mostraram que não houve efeito do homecage [$X^2(1) = 1,62$ $p=0,202$], do consumo [$X^2(1) = 0,013$, $p = 0,907$], do treinamento [$X^2(1) = 1,15$, $p=0,282$] e também não houve efeito em nenhuma das interações. Os valores da porcentagem de exploração permaneceram em torno de 50%. Isso indica que os grupos exploraram de forma semelhante os dois objetos (Objeto A1: $20,44 \pm 0,84s$; Objeto A2: $22,96 \pm 0,95s$).

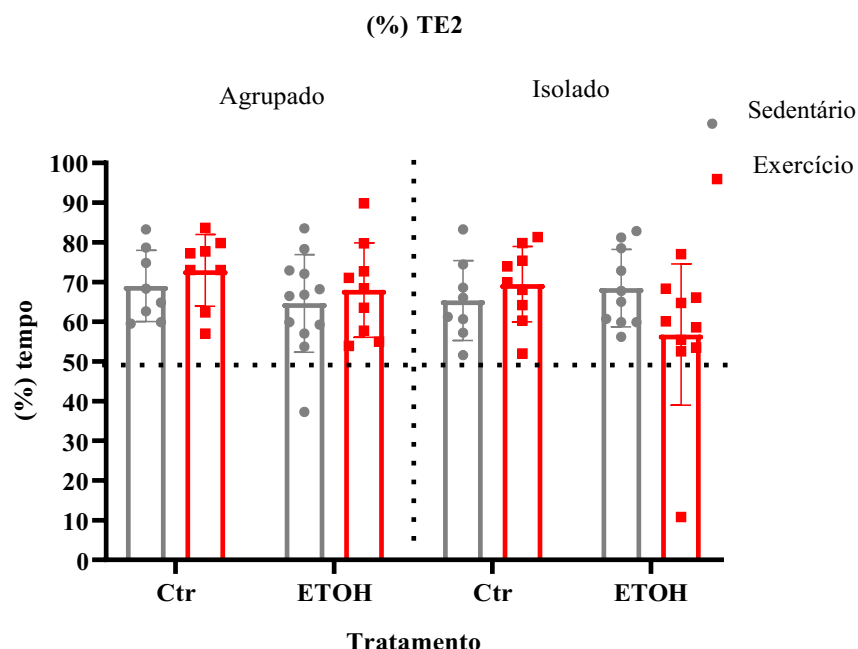
Figura 80. (Gráfico da % tempo de exploração dos objetos na habituação. Nele pode-se observar que não houve efeito dos fatores (homecage, tratamento e treinamento) e como as medidas de tempo ficaram próximas a 50%, exploraram igualmente os dois objetos.



Teste de 1h (A1 e B) (%TE2):

Em relação à porcentagem do tempo de exploração para o teste de 1h (%TE2), a distribuição que aderiu melhor aos dados foi a Normal (AIC =583,78). Os resultados apresentados na figura 81, para (%TE2), mostraram que não houve efeito do homecage [$X^2(1) = 1,74$ $p=0,186$], do consumo [$X^2(1) = 2,96$, $p = 0,085$], do treinamento [$X^2(1) = 0,001$, $p=0,972$] e também não houve efeito em nenhuma das interações. Os valores da porcentagem de exploração ficaram acima de 50%. Portanto, os animais exploraram mais o objeto novo B em comparação ao objeto familiar A1.

Figura 81. Gráfico da % tempo de exploração dos objetos no teste de 1 hora. Nele pode-se observar que a porcentagem permaneceu acima de 50%, indicando que os animais exploraram mais o objeto B do que o A1.



Teste de 24h (A1 e C) (%TE3):

A porcentagem do tempo de exploração para o teste de 24h (%TE3), aderiu melhor na distribuição Normal (AIC =609,05). Os resultados apresentados na figura 82, para (%TE3), mostraram que houve efeito do homecage [$X^2(1) = 10,09$ $p=0,001$], mas não houve efeito do consumo [$X^2(1) = 2,36$, $p = 0,124$], do treinamento [$X^2(1) = 0,076$, $p=0,783$] e também não houve efeito em nenhuma das interações.

Em relação à homecage, após o post Hoc de Bonferroni, foi possível observar que ocorreu uma diminuição no tempo de exploração entre os animais isolados quando comparado aos sociáveis (Bonferroni $p=0,002$) [Isolado: $65,5 \pm 2,29$; Agrupados: $75,9 \pm 2,32$]. Portanto independente do consumo e treinamento, os animais isolados apresentaram uma diminuição no tempo de exploração do objeto novo.

Figura 82. Gráfico da % tempo de exploração dos objetos no teste de 24 horas. Nele pode-se observar que a porcentagem permaneceu acima de 50%, indicando que os animais passaram mais tempo explorando o objeto C do que o objeto A1.

